

Université de Montréal

Étude du polymorphisme intra- et inter-spécifique du gène β -tubuline chez des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules en vue de développer des marqueurs moléculaires

Par

Nadia Zeramdini

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en sciences biologiques

Octobre, 2009

© Nadia Zeramdini, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du polymorphisme intra- et inter-spécifique du gène β -tubuline chez des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules en vue de développer des marqueurs moléculaires

Présenté par :
Nadia Zeramdini

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luc Brouillet, président-rapporteur
Mohamed Hijri, directeur de recherche
Marc St-Arnaud, co-directeur
Yves Piché, membre du jury

Résumé

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), classés dans le phylum Glomeromycota, ne peuvent pas être facilement identifiés par la morphologie de leurs spores et leurs mycélia à l'intérieur ou à l'extérieur des racines de leurs hôtes. Ce problème fondamental d'identification rend l'étude de leur diversité, en particulier dans leur habitat naturel (sol et racine) extrêmement difficile.

Les gènes ribosomaux ont été largement utilisés pour développer des amorces spécifiques et en inférer des arbres phylogénétiques. Cependant, ces gènes sont très polymorphes et existent en plusieurs copies dans le génome des CMA, ce qui complique l'interprétation des résultats.

Dans notre étude, nous avons étudié le polymorphisme intra- et inter-spécifique du gène β -tubuline, présent en faible nombre de copies dans le génome des CMA, afin d'obtenir de nouvelles séquences nucléotidiques pour développer des marqueurs moléculaires. Les gènes β -tubuline amplifiés à partir de l'ADN génomique de cinq espèces du genre *Glomus* ont été clonés et séquencés. L'analyse des séquences indique un polymorphisme intra-spécifique chez trois espèces de CMA. Deux séquences paralogues très variables ont été nouvellement identifiées chez les *G. aggregatum*, *G. fasciculatum* et *G. cerebriforme*. Aucun polymorphisme n'a été détecté chez les *G. clarum* et *G. etunicatum*. Toutes les séquences montrent la présence de deux introns hautement variables. La majorité des substitutions ont été localisées dans les exons et sont synonymes à 90%. La conservation des acides aminés suggère un niveau élevé de sélection négative sur le gène β -tubuline et nous permet de confirmer que les CMA représentent un ancien groupe fongique (400 million d'années). L'analyse phylogénétique, réalisée avec vingt et une séquences nucléotidiques du gène β -tubuline, a révélé que les séquences des Glomaceae forment un groupe monophylétique bien supporté, avec les Acaulosporaceae et Gigasporaceae comme groupe frère. Les séquences paralogues nouvellement identifiées chez les *G. aggregatum* et *G. fasciculatum* n'ont pas été monophylétiques au sein de chaque espèce. Les oligonucléotides ont été choisis sur la base des régions variables et conservées du gène β -tubuline. Le test PCR des amorces β -Tub.cerb.F/ β -Tub.cerb.R a révélé des bandes spécifiques de 401 pb pour les séquences paralogues du *G. cerebriforme*. Deux paires

d'amorces ont été développées afin d'identifier les séquences du groupe nommé Tub.1. Les tests PCR nous ont permis d'identifier certaines séquences du groupe Tub.1. Une paire d'amorce β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R nous a permis d'identifier certaines séquences paralogues du groupe nommé Tub.2.

L'analyse d'autres gènes combinée à celle du gène β -tubuline permettra le développement de marqueurs moléculaires plus spécifiques pour l'identification de CMA.

Mots-clés : CMA, gène β -tubuline, polymorphisme intra- et inter-spécifique, marqueurs moléculaires, identification.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are classified in the phylum Glomeromycota. This fungal group cannot be easily identified using morphology of their spores and hyphae inside or outside plant-roots. This fundamental problem renders the study of their diversity extremely difficult, particularly in their natural habitat (soil and roots).

The ribosomal genes have been widely used to develop specific primers and to infer phylogenetic trees. However, these genes are highly polymorphic and exist in multiple copies in the genome of the AMF. This leads misinterpretation of the results.

In our study, we analysed the intra- and inter specific polymorphism of the β -tubulin gene, which is present in low copy number in AMF genome, to obtain further nucleotide sequences to develop molecular markers.

β -tubulin genes were sequenced from genomic DNA of five *Glomus* species. PCR amplified β -tubulin genes were cloned and sequenced. Intra- and inter-specific polymorphism analyses indicate the polymorphic nature of β -tubulin gene in three AMF species. Two highly variable β -tubulin paralogs were newly identified in *G. aggregatum*, *G. fasciculatum* and *G. cerebriforme*. No evidence for the presence of paralogs was found in *G. clarum* and *G. etunicatum*. All AMF sequences show the presence of two introns, which are highly variable. The majority of substitutions are located in the exons and 90% are synonymous. The conservation of amino-acids level suggests a high level of negative selection acting on the β -tubulin gene and allows us to consider that the AMF represent an ancient fungal group (400 million years). A phylogenetic analysis, carried out with twenty-one β -tubulin nucleotidic sequences, revealed that the sequences of Glomeraceae form a highly supported monophyletic group with Acaulosporaceae and Gigasporaceae as sister-group. The newly identified paralogs from *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* were not found to be monophyletic within each species. Oligonucleotides were designed in the conserved and variable regions. PCR amplification test of β -Tub.cerb.F / β -Tub.cerb.R revealed specific bands of 401 bp for the *G. cerebriforme* paralogs. Two pairs of primers were developed to identify sequences of the group named Tub.1. PCR tests have allowed us to identify certain sequences of Tub.1 group. A primer pair of β -Tub.2.F / β -Tub.2.R we identified some sequences paralogous group named Tub.2. Analysis of other genes

combined with that of β -tubulin gene enable the development of more specific molecular markers for AMF identification.

Keywords: AMF, β -tubulin gene, intra- and inter-specific polymorphism, molecular markers, identification.

Table des matières

Résumé.....	iii
Mots-clés.....	iv
Abstract.....	v
Keywords.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xx
Avant-propos.....	xxi
Chapitre 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.	
Introduction.....	2
1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules.....	2
2. Développement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules.....	7
2.1. Germination des spores.....	7
2.2. Formation de l'appressorium: étape avant la colonisation intraracinaire.....	8
2.3. Développement intraracinaire et formation d'arbuscules.....	10
2.4. Développement extraracinaire du mycélium.....	13
2.4.1. Les «runner hyphae».....	14
2.4.2. Les fines branches «fine branching».....	14
2.5. Sporulation du mycélium extraracinaire.....	14
3. Métabolisme et bénéfices des CMA.....	19
4. Histoire évolutive des CMA.....	21
5. Systématique des champignons endomycorhiziens arbusculaires.....	22
6. Conclusion.....	28
Chapitre 2. Study of intra- and inter-specific polymorphism of the β -tubulin gene among arbuscular mycorrhizal fungal species in order to develop molecular markers.	
Résumé.....	30
Mots-clés.....	31

Abstract	32
Keywords.	32
1. Introduction	33
2. Materials and methods	36
2.1. Fungal material	36
2.2. DNA extraction	37
2.3. Amplification of the β -tubulin gene	37
2.4. Cloning and sequencing	38
2.5. Screening positive transformants by PCR	39
2.6. Phylogenetic analysis and primer design	39
3. Results	40
3.1. Intraspecific β -tubulin gene polymorphism	40
3.2. Phylogenetic analysis	49
3.3. Molecular markers and specificity tests	53
4. Discussion	62
Conclusion générale	66
Bibliographie générale	69
Annexe. Identification morphologique et étude des caractéristiques ultrastructurales chez des espèces de CMA.	
1. Introduction	83
2. Matériel et méthodes	84
2.1. Matériel fongique	84
2.2. Extraction des spores à partir du sol	86
2.2.1. Extraction des spores par tamisage humide	86
2.2.2. Séparation des spores avec une solution de saccharose	86
2.3. Coloration et identification des spores	86
3. Résultats	88
3.1. <i>G. caledonium</i>	88
3.2. <i>G. constrictum</i>	90
3.3. <i>G. geosporum</i>	91
3.4. <i>G. mosseae</i>	92

3.5. <i>G. lamellosum</i>	93
3.6. <i>G. multiforum</i>	94
3.7. <i>G. albidum</i>	95
3.8. <i>G. kerguelense</i>	96
3.9. <i>Scutellospora gilmorei</i>	97
3.10. <i>Gigaspora margarita</i>	98
4. Conclusion	99

Liste des tableaux

Chapitre 2. Study of intra- and inter-specific polymorphism of the β -tubulin gene among arbuscular mycorrhizal fungal species in order to develop molecular markers.

Table 2.1: Intraspecific polymorphism analysis for β -tubulin gene within five AMF species. 48

Table 2.2: List of β -tubulin gene sequences used for the phylogenetic analysis and primers design. Sequences with accession number were retrieved from public databases. Sequences with clone numbers were newly identified by cloning β -tubulin gene. 51

Table 2.3: Primer pairs designed for some AMF species from variable and conserved regions of β -tubulin sequences. 55

Annexe. Identification morphologique et étude des caractéristiques ultra-structurales chez des espèces de CMA.

Tableau. 3.1 : Espèces de CMA utilisées dans l'étude des caractères morphologiques. 85

Liste des figures

Chapitre 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.

- Fig. 1.1 :** Hyphe coenocytique de CMA observé au microscope confocal. Les noyaux colorés par le SytoGreen en vert, se déplacent librement dans un mouvement bidirectionnel. Échelle = 5 μ m. (Hijri M). 4
- Fig. 1.2 :** Sporocarpe de *G. sinuosum* (nommé auparavant *Sclerocystis sinuosa*). Les spores sont disposées sur un hyphe, étroitement liées et couvertes par un "Péridium". Le diamètre du sporocarpe est approximativement de 250 μ m. Échelle = 100 μ m. (Redecker & Raab, 2006). 4
- Fig. 1.3 :** Structure de la paroi de *Gigaspora margarita*. L'épaisseur totale de la paroi est d'environ 39 μ m. La paroi est composée de deux couches pariétales (P1 et P2) et d'une paroi de germination (Pg). Échelle = 200 μ m. (photographie N. Zeramdini)..... 6
- Fig. 1.4 :** Hyphe externe produisant deux appressoriums (App) entre les cellules de l'épiderme d'une racine de plante. Échelle = 100 μ m. (Brundrett *et al.*, 1985). 9
- Fig. 1.5 :** Arbuscule mature formé dans une racine de poireau (*Allium porrum*). L'arbuscule est formé d'un tronc (T) et de nombreuses branches ramifiées autour (flèches). Échelle = 10 μ m. (Brundrett *et al.*, 1984). 12
- Fig. 1.6 :** Vésicules de *G. albidum* produites dans une racine de poireau (*Allium porrum*). La racine contient également de nombreux hyphes intercellulaires. Échelle = 200 μ m. (photographie N. Zeramdini). 12
- Fig. 1.7 :** Spore multinucléée vivante de *G. diaphanum* prise au microscope confocal. Les noyaux dont l'ADN a été coloré par le SytoGreen apparaissent sous forme de points verts. Échelle = 14.56 μ m. (Hijri M). 15

Fig. 1.8 : Variation de la couleur des spores entre des espèces de CMA du même genre et de genres différents. Genre *Glomus* (A, B, C et D), genre *Gigaspora* (E) et genre *Scutellospora* (F). A: *G. mosseae*; B: *G. constrictum*; C: *G. geosporum*; D: *G. kerguelense*; E: *Gigaspora margarita* et F: *Scutellospora gilmorei*. Échelle = 200 μ m. (photographies N. Zeramdini)..... 17

Fig. 1.9 : Cellules auxiliaires (Aux) de *Gigaspora margarita* observées au microscope optique. La surface des cellules auxiliaires est couverte d'ornementations (Orne). Échelle = 200 μ m. (photographie N. Zeramdini)..... 18

Fig. 1.10 : Analyse phylogénétique des CMA basée sur les séquences nucléotidiques du gène 18S de l'ARNr. Les CMA (Glomeromycota) formeraient un phylum monophylétique complètement séparé des Endogone (Zygomycota). (Schussler *et al.*, 2001a)..... 27

Chapitre 2. Study of intra- and inter-specific polymorphism of the β -tubulin gene among arbuscular mycorrhizal fungal species in order to develop molecular markers.

Fig. 2.1: A; The *in vitro* compartmentalized system showing carrot roots growing in a proximal compartment while the fungus producing spores grows in the distal compartment. B; close up of the distal compartment showing higher density of spores and hyphae of *G. intraradices* 197198. Bar = 200 μ m. (photography N. Zeramdini). 36

Fig. 2.2: Agarose gel (1%) electrophoresis of amplified β -tubulin gene using the β .Tub.F/ β .Tub.R primers. Lane 1-5, amplification product of β -tubulin gene; lane 1: *G. etunicatum*; lane 2, *G. aggregatum*; lane 3, *G. fasciculatum*; lane 4, *G. cerebriforme* and lane 5, *G. clarum*. Lane 6-10, amplification product of α -tubulin gene. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder)..... 38

Fig. 2.3: *G. etunicatum* sequences alignment showing: no evidence of polymorphism. 43

Fig. 2.4: *G. cerebriforme* sequences alignment showing the presence of two paralogs..... 44

Fig. 2.5: *G. aggregatum* sequences alignment showing the presence of two paralogs. 45

Fig. 2.6: *G. fasciculatum* sequences alignment showing the presence of two paralogs. 46

Fig. 2.7: *G. clarum* sequences alignment showing no evidence of polymorphism. 47

Fig. 2.8: Neighbor-joining tree generated using all codon positions of the β -tubulin nucleotide sequences. Chytridiomycota sequences were used as out-group. Paralogs were numbered according to their clustering in the phylogeny. Numbers at nodes correspond to bootstrap support from a neighbor-joining analysis (1000 replicates). Scale bar represents 0.05 substitutions per site. 52

Fig. 2.9: Primer pairs positions on AMF β -tubulin sequences alignment. The name of primers is marked at the top of sequences alignment. 57

Fig. 2.10: Agarose gel electrophoresis of β -tubulin fragments, from the group Tub.1, amplified by PCR using primers: β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R. Negative control: lane 1, *G. cerebriforme*. Positive controls: lane 2, *G. aggregatum*; lane 3, *G. fasciculatum*; lane 4, *G. etunicatum*; lane 5, *G. clarum*; lane 6, *G. diaphanum* and lane 7, *G. intraradices*. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder). 58

Fig. 2.11: Agarose gel electrophoresis of β -tubulin fragments, from the group Tub.1, amplified by PCR using primers: β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R. Lane 1-4, negative controls; Lane 1, *G. fasciculatum* 2; lane 2, *G. aggregatum* 2; lane 3, *G. cerebriforme* 1 and lane 4, *G. cerebriforme* 2. Lane 5-11, positive controls; Lane 5, *G. intraradices* geo-rac; lane 6, *G. intraradices* 197198; lane 7, *G. aggregatum* 1; lane 8, *G. diaphanum* 1; lane 9, *G. fasciculatum* 1; lane 10, *G. etunicatum* and lane 11, *G. clarum*. Lane 1kb, molecular size marker. 59

Fig. 2.12: Agarose gel electrophoresis of *G. cerebriforme* β -tubulin fragment by PCR using pair primers: β -Tub.cerb.F/ β -Tub.cerb.R. Lane 1-3, negative controls; lane 1, *G.*

etunicatum; lane 2, *G. aggregatum* 1 and lane 3, *G. fasciculatum* 1. Lane 4, *G. cerebriforme* with the expected size of 401 bp. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder). 60

Fig. 2.13: Agarose gel electrophoresis of β -tubulin fragment amplified by PCR using pair primers: β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R. Lane 1-6, negative controls; lane 1, *G. fasciculatum* 1; lane 2, *G. aggregatum* 1; lane 3, *G. clarum*; lane 4, *G. etunicatum*; lane 5, *G. cerebriforme* 1 and lane 6, *G. cerebriforme* 2. Lane 7-11, positive controls; lane 7, *G. intraradices* geo-rac; lane 8, *G. intraradices* 197198; lane 9, *G. diaphanum*; lane 10, *G. fasciculatum* 2 and lane 11, *G. aggregatum* 2. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder)..... 61

Annexe. Identification morphologique et étude des caractéristiques ultra-structurales chez des espèces de CMA.

Fig. 3.1. Caractéristiques morphologiques de la paroi sporale et de l'hyphe de *G. caledonium*. A: aspect de la paroi sporale observée sous PVLG sans coloration préalable; B: aspect des couches pariétales avec le réactif Melzer; C: structure de l'hyphe suspenseur et la composition de sa paroi avec le réactif Melzer. Échelle = 200 μ m. (photographies N. Zeramdini)..... 89

Fig. 3.2. Structure de la paroi sporale de *G. constrictum*. A : spore écrasée montrant la présence des deux couches pariétales P1 et P2; B : structure de la P1; C : spore entière de *G. constrictum* avec présence de la constriction au niveau de l'hyphe. Échelle A, B = 100 μ m, C = 50 μ m. (photographies N. Zeramdini). 90

Fig. 3.3. Structure de la paroi sporale et la structure de l'hyphe suspenseur de *G. geosporum* avec PVLG sans coloration préalable. Échelle = 100 μ m. (photographies N. Zeramdini)..... 91

Fig. 3.4. Caractéristiques morphologiques de la spore et de l'hyphe de *G. mosseae*. A: structure de la paroi sporale avec PVLG sans coloration préalable; B: structure de la P2 et

P3 avec le réactif Melzer; C: structure de la paroi de l'hyphe avec le réactif Melzer. Échelle = 100 µm. (photographies N. Zeram dini). 92

Fig. 3.5. Caractéristiques morphologiques de la spore de *G. lamellosum*. A: structure des couches pariétales avec PVLG sans coloration; B: observation des parois pariétales avec PVLG coloré au réactif Melzer; C: observation de l'absence de réaction des parois au contact du bleu coton au lactophénol. Échelle = 100 µm. (photographies N. Zeram dini). . 93

Fig. 3.6. Caractéristiques morphologiques de la spore de *G. multiforum*. A: observation de la structure des couches pariétales et de l'aspect granuleux de la P3 avec du PVLG coloré au réactif Melzer; B: structure détaillée de la P2 et de la P3. Échelle A = 100 µm, B = 200 µm. (photographies N. Zeram dini). 94

Fig. 3.7. Caractéristiques morphologiques de la spore de *G. albidum*. A: structure des couches pariétales avec du PVLG coloré au Melzer; B: structure de P2, de P3 et structure de l'hyphe suspenseur. Échelle = 50 µm. (photographies N. Zeram dini)..... 95

Fig. 3.8. Structure de la paroi sporale de *G. kerguelense*. A: structure des couches pariétales d'une spore jeune avec la présence des trois parois pariétales; B: structure des couches pariétales d'une spore mature montrant la P1 partiellement dégradée et le septum formé par la P3 au niveau de l'hyphe suspenseur. Échelle = 100 µm. (photographies N. Zeram dini). 96

Fig. 3.9. Caractéristiques morphologiques de la spore de *Scutellospora gilmorei*. A: structure de la couche P1 avec PVLG sans coloration; B: aspect laminé de la couche P2 et aspect granuleux de la paroi de germination P3 avec du PVLG coloré au réactif Melzer; C: structure de la couche P1 et de la P2 avec du PVLG coloré au réactif bleu coton au lactophénol et observation des cloisons au niveau de l'hyphe suspenseur. Échelle = 100 µm. (photographies N. Zeram dini). 97

Fig. 3.10. Caractéristiques morphologiques de la spore de *Gigaspora margarita*. A: structure de la paroi sporale; B: structure de l'hyphe suspenseur coloré au réactif Melzer; C:

structure des cellules auxiliaires. Échelle A = 100 μm , B, C = 50 μm . (photographies N. Zeramdini).....	98
---	----

Liste des sigles et abréviations

AMF: Arbuscular mycorrhizal fungi

β -tubuline: Beta-tubuline

bp: Base-pairs

cDNA: Complementary Deoxyribonucleic acid

C: Carbone

^{13}C : Carbone 13, un isotope naturel stable du carbone

$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

CMA: Champignons mycorrhiziens à arbuscules

CRECO: Centre de recherches de l'Est sur les céréales et les oléagineux

DAOM : Herbar national de mycologie, Ottawa, Canada

DNA: Desoxyribonucleic acid

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GC: Glomus cerebriforme

GE: Glomus etunicatum

G: Glomus

g: Gramme

GINCO: Glomeromycota in Vitro Collection

h: Heure

ITS: Internal Transcribed Spacer

IGS: Intergenic Spacer

INVAM: International culture collection of arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Kb: kilobases

LSU rRNA: Large Subunit ribosomal ribonucleic acid gene

mm: Millimètre

µm: Micromètre

µl: Microlitre

M: Molaire

ng: Nanogramme

18S: 18S ribosomal RNA gene

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pg: Paroi de germination

pH: Potentiel Hydrogène

PVLG : Polyvinylique-Lacto-Glycérol

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

rRNA: Ribosomal ribonucleic acid gene

rpm: Rotation par minute

s: Seconde

SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism

SOC medium: Super Optimal broth

SSU rRNA: Small Subunit ribosomal ribonucleic acid gene

T_m: Température d'hybridation

U : Unité

À tous ceux qui ont cru en moi

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Mohamed Hijri, pour son engagement continu, ses suggestions avisées et ses judicieux commentaires qui ont facilité ma vie sur le terrain et porté plus loin ma pensée et mon analyse scientifique.

J'aimerais également témoigner de ma reconnaissance à l'égard de mon codirecteur, Dr Marc St-Arnaud, pour son indéfectible soutien, ses questions à la fois pertinentes et stimulantes et pour ses judicieux conseils qui m'ont permis d'acquérir les connaissances et compétences nécessaires pour mener à bon port ce projet.

Je tiens à remercier le Dr Yolande Dalpé pour son chaleureux accueil dans son laboratoire à Ottawa, pour m'avoir transmis une partie de son savoir et sa passion pour les champignons. Je tiens aussi à remercier mon conjoint Mondher qui a cru en moi et a su être à mes côtés dans mes hauts et mes bas. Je remercie aussi les membres de ma famille, qui malgré la distance qui nous sépare, ont su m'encourager à atteindre mon but.

Enfin, je voudrais remercier mes collègues de laboratoire, tous les membres de l'IRBV (chercheurs, techniciens et étudiants) ainsi que toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Avant-propos

Le présent mémoire comporte trois sections. Le chapitre 1 présente une revue bibliographique. Le chapitre 2 a été rédigé sous forme d'article scientifique en vue d'être publié dans un journal scientifique. Les résultats présentés dans ce chapitre sont le fruit de longs mois de recherche. Tout au cours de ce processus entamé dès l'automne 2006, ma recherche en laboratoire ainsi que la recherche bibliographique, ont été ma priorité. En étant premier auteur, la compilation et l'analyse de mes résultats, en plus de la rédaction et l'élaboration de ce chapitre ont été réalisées en totalité par moi-même.

Mon directeur Mohamed Hijri et mon codirecteur Marc St-Arnaud, tous deux co-auteurs, ont su me guider tout au long de ce processus par leurs corrections et leurs commentaires pertinents.

La partie annexe représente les résultats obtenus lors d'un stage, d'une durée d'un mois, réalisé dans le laboratoire du Dr Yolande Dalpé, pendant lequel j'ai appris l'identification morphologique de quelques espèces de champignons mycorhiziens. L'échantillonnage du matériel fongique, l'élaboration des résultats, la réalisation des photographies ainsi que la rédaction de cette section ont été réalisés en totalité par moi-même.

Chapitre 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction

Les associations symbiotiques entre les champignons et les racines des plantes ont été un sujet de recherche très captivant pour plusieurs générations de biologistes. Vers la fin des années 1880, ces associations ont été nommées Mycorhizes. Le terme mycorhize, dérivé du grec, signifie champignon-racine (mukês = champignon, rhiza = racine).

Il existe plusieurs formes d'associations mycorhiziennes telles que les mycorhizes arbusculaires, les ectomycorhizes, les mycorhizes des orchidées et les mycorhizes des éricacées. Parmi toutes les mycorhizes, les mycorhizes à arbuscules sont de loin les plus importantes et les plus répandues dans la nature.

De récentes observations de plantes fossiles du Dévonien suggèrent que les mycorhizes à arbuscules, existent depuis plus de 400 millions d'années. Cela indique que les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) auraient formé des associations symbiotiques avec les racines des premières plantes colonisant les écosystèmes terrestres.

Malgré l'ubiquité des champignons mycorhiziens à arbuscules et leur importance dans le mouvement des nutriments entre les plantes et le sol, nos connaissances sur la biodiversité et l'identification de ces microorganismes restent limitées et laborieuses. L'objet de mon étude est de proposer un nouvel outil d'identification moléculaire basé sur le développement de marqueur utilisant le gène fonctionnel codant pour la β -tubuline.

1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), connus aussi sous le nom champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules (MVA), sont des symbiotes obligatoires qui forment des associations avec environ 80% des plantes (Fortin *et al.*, 2008).

Les mycorhizes à arbuscules sont formées par trois composants essentiels : les racines de la plante hôte, fongiques formées dans et entre les cellules du cortex racinaire et le mycélium extraracinaire qui se développe les structures dans le sol (Smith & Read, 2008).

Le terme « arbusculaire » réfère à une structure microscopique caractéristique de cette symbiose et nommée arbuscule. Les champignons endomycorhiziens pénètrent à l'intérieur

des cellules du cortex racinaire de la plante hôte, contrairement aux champignons ectomycorhiziens où le champignon forme un manteau entourant les racines et dont certains hyphes pénètrent dans la racine et prolifèrent entre les cellules corticales. La formation des arbuscules se produit à l'intérieur des cellules corticales, toutefois sans contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte. Plusieurs CMA forment, en plus des arbuscules, des vésicules intercellulaires d'où l'appellation mycorhizes à vésicules et arbuscules.

Le développement des CMA ne se limite pas à la racine seulement. À partir d'un point d'ancrage dans la racine, le champignon développe dans le sol une phase extraracinaire qui s'étend en un réseau mycélien et envahit le sol adjacent dans toutes les directions. Le mycélium du CMA qui pousse dans le sol peut atteindre des kilomètres de longueur (Fortin *et al.*, 2008). Le mycélium, de très fine dimension, augmente considérablement le volume de sol exploité par les racines, améliorant ainsi leur nutrition en sel minéraux et l'accès à l'eau. Le champignon est capable de proliférer et d'infecter aussi les racines de la plupart des plantes voisines sans aucune spécificité apparente. Ceci implique que les plantes occupant la même niche écologique sont interconnectées via le mycélium fongique.

Les CMA forment principalement des hyphes coenocytiques dont les organites cellulaires et les noyaux se déplacent librement en un mouvement bidirectionnel dans le vaste mycélium (Fig. 1.1). En revanche, le champignon peut former des hyphes cloisonnés surtout en culture *in vitro* (Fortin *et al.*, 2008; Smith & Read, 2008). Les CMA forment des spores asexuées individuelles ou en grappe à partir des hyphes extraracinaires dans le sol. Certains champignons produisent des spores regroupées en amas (d'environ 0,5 mm de diamètre) et entourées par des structures mycéliennes ou des membranes, appelées sporocarpes (Krishna, 2005) (Fig. 1.2).

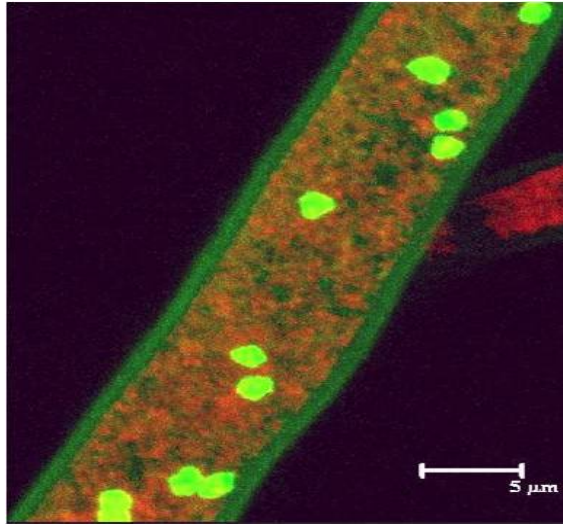


Fig. 1.1 : Hyphe coenocytique de CMA observé au microscope confocal. Les noyaux colorés par le SytoGreen en vert, se déplacent librement dans un mouvement bidirectionnel. Échelle = 5 μm . (Hijri M).

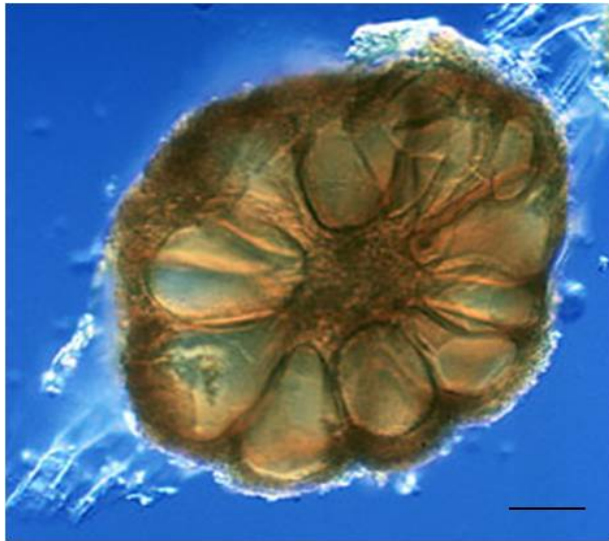


Fig. 1.2 : Sporocarpe de *G. sinuosum* (nommé auparavant *Sclerocystis sinuosa*). Les spores sont disposées sur un hyphe, étroitement liées et couvertes par un "Péridium". Le diamètre du sporocarpe est approximativement de 250 μm . Échelle = 100 μm . (Redecker & Raab, 2006).

Comparativement aux spores des autres champignons, qui ont un diamètre généralement compris entre 5 et 20 micromètres, celles des champignons mycorrhiziens à arbuscules sont beaucoup plus larges, et peuvent atteindre des dimensions imposantes allant jusqu'à 500 micromètres. Ces spores ont la caractéristique de contenir des centaines et même des milliers de noyaux et des quantités élevées de réserves de lipides et d'hydrate de carbone (Smith & Read, 2008). Elles possèdent également des parois ou enveloppes extrêmement épaisses de 2 à 35 micromètres qui les protègent contre les stress environnementaux, leur conférant ainsi une longévité importante (Fig. 1.3) (Fortin *et al.*, 2008). Les spores représentent la meilleure source d'inoculum et les seules structures qui permettent l'identification morphologique des espèces de CMA. Par conséquent, elles sont d'une importance capitale dans l'isolement de ces espèces, la détermination de leur distribution dans le sol et leur utilisation à des fins d'identification.

La composition des espèces et l'abondance de la population des spores, ainsi que la contribution des spores à la colonisation, sont probablement influencés par toute une série de facteurs liés à la production de spores, tels que la dormance et la germination. Ces facteurs varient à leur tour selon l'espèce fongique, l'espèce de plante colonisée ainsi que les perturbations des conditions environnementales. Cependant, il n'existe pas de corrélation entre le nombre de spores et le degré de colonisation des racines par le champignon. En effet, dans certains habitats, les spores ne sont pas présentes durant toute la saison de croissance et elles sont à leur maximum d'abondance pendant d'autres saisons (Smith & Read, 2008). L'identification de ces microorganismes fongiques est ardue et leur classification s'est avérée être un défi important. Jusqu'à présent, approximativement 200 espèces de CMA sont décrites et classées dans le phylum Glomeromycota du règne Eumycota (Schüssler *et al.*, 2001a).

Les Glomeromycota ont été subdivisés en deux ordres, Glomineae et Gigasporineae. Le premier ordre contient deux familles: les Glomaceae et Acaulosporaceae et le second ordre contient une seule famille: les Gigasporaceae (Morton & Benny, 1990).

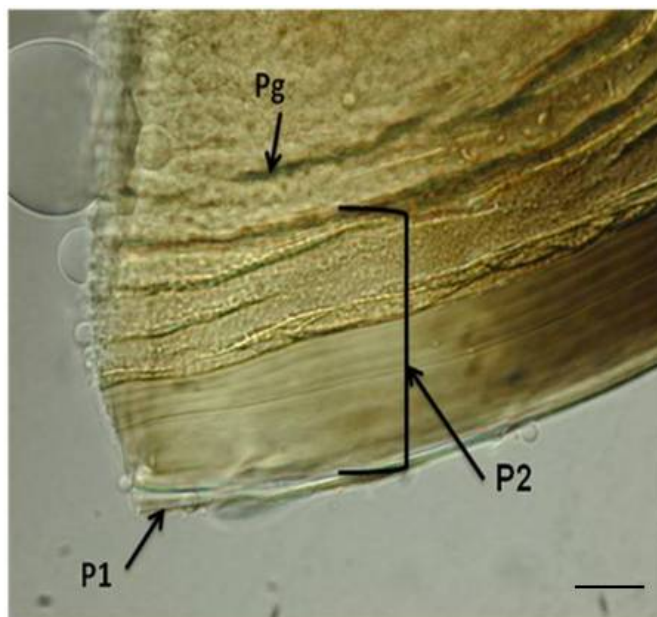


Fig. 1.3 : Structure de la paroi de *Gigaspora margarita*. L'épaisseur totale de la paroi est d'environ 39 μm . La paroi est composée de deux couches pariétales (P1 et P2) et d'une paroi de germination (Pg). Échelle = 200 μm . (photographie N. Zeramdini).

2. Développement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

2.1. Germination des spores

Les conditions physiques, chimiques et microbiologiques adéquates pour stimuler une spore en dormance et provoquer sa germination sont variables. Dans la nature, des interactions complexes entre plusieurs facteurs tels que le pH du sol, la température, l'humidité, les éléments nutritifs organiques et minéraux des racines, leurs exsudats et leur composition microbienne peuvent déclencher la germination des spores des CMA (Krishna, 2005).

En effet, les exsudats racinaires et les composés volatiles tel que le CO² provenant de la respiration racinaire, peuvent déclencher la germination des spores et le début de croissance du tube germinatif (St-Arnaud *et al.*, 1996). Dans certains cas les exsudats racinaires déclenchent également une croissance rapide et très étendue des branches de l'hyphe. Ce type de réaction a été observé seulement lorsque les hyphes approchent les racines de la plante hôte (Harrison, 1999). Les exsudats racinaires des plantes non hôtes comme *Beta vulgaris* ou *Raphanus sativus* n'influencent pas la germination des spores des CMA (Krishna, 2005).

La nature des composants actifs présents dans les exsudats racinaire des plantes n'est pas très connue. Toutefois, par analogie avec les interactions *Rhizobium*-légumineuses et *Agrobacterium*-plante, il a été démontré que certains flavonoïdes et composés phénoliques stimulent considérablement la germination des spores et la croissance du tube germinatif (St-Arnaud *et al.*, 1996; Steinkellner *et al.*, 2007).

De récentes études sur l'influence du froid sur la germination des spores de l'espèce *Glomus intraradices* ont révélé la croissance de deux types d'hyphes à partir du tube germinatif (Juge *et al.*, 2002), ce qui concorde avec ce qu'avait rapporté Barbara Mosse (Mosse, 1959). En effet, sous des conditions de stress ou lorsque la dormance de la spore n'est pas complètement rompue, le tube germinatif développe de fines branches enroulées en spirales autour de la spore avec plusieurs anastomoses (*g-type pattern*) (Juge *et al.*, 2002). Si la spore est sous des conditions favorables et si la dormance de cette dernière est complètement levée, le tube germinatif produit plutôt des hyphes appelées les *runner-*

hyphae (G-type pattern). Ces hyphes sont réguliers et poussent très rapidement suivant un angle droit vers la racine. Ce dernier type d'hyphes permet au champignon de coloniser une nouvelle racine (Juge *et al.*, 2002).

Le tube germinatif et ses hyphes pré-symbiotiques ont pour rôle de créer de nouvelles colonisations racinaires. Cependant, en l'absence d'une racine hôte adéquate, l'élongation du tube germinatif est bloquée. Ce dernier emploie une stratégie de survie caractéristique de ce type de symbiotes obligatoires. Après deux à quatre semaines de croissance sans colonisation de racines compatibles, le tube germinatif se rétracte et procède au processus de formation des cloisons (compartimentation du cytoplasme). Cependant, cette stratégie de survie ne fonctionne pas chez certains types de champignons où la spore devient moribonde (Juge, 2008; Juge, 2009).

2.2. Formation de l'appressorium: étape avant la colonisation intraracinaire

Le développement de la symbiose commence au moment où l'hyphe du champignon contacte la racine de la plante hôte. Le contact de l'hyphe est suivi d'une adhésion puis de la formation d'un appressorium à partir duquel se développera la phase intraracinaire de la croissance du champignon (Fig. 1.4) (Smith & Read, 2008). La formation de l'appressorium prend généralement place deux à trois jours après le rattachement de l'hyphe à la surface de la racine de la plante (Juge, 2009). Contrairement à la germination des spores, les exsudats racinaires n'influencent pas la formation de l'appressorium. Le seul inducteur de ce phénomène est le contact physique de l'hyphe avec la racine (Harrison, 1999).

La formation de l'appressorium est directement suivie par la pénétration de l'hyphe dans la racine (Harrison, 1999). Entre le premier rattachement de l'hyphe sur la racine et la pénétration intercellulaire, il s'écoule généralement trois jours (Bécard & Fortin, 1988).

La pénétration peut s'effectuer de différentes manières. Chez certaines espèces, l'hyphe exerce une force mécanique entre deux cellules épidermiques.

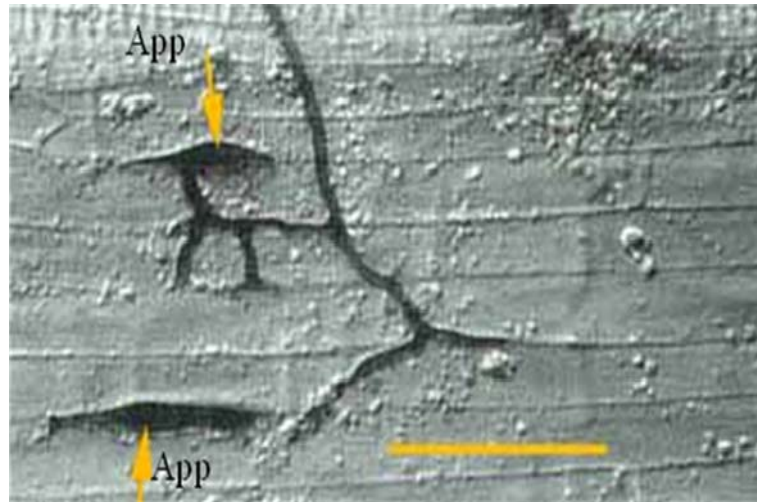


Fig. 1.4 : Hyphe externe produisant deux appressoriums (App) entre les cellules de l'épiderme d'une racine de plante. Échelle = 100 μm . (Brundrett *et al.*, 1985).

Chez d'autres espèces, l'hyphe passe à travers la paroi cellulaire de la cellule épidermique de la racine (Cox & Sanders, 1974; Harrison, 1999). Le mécanisme exact responsable de la pénétration de l'hyphe est inconnu. Cependant, par analogie avec quelques champignons pathogènes biotrophes, il a été suggéré que la production localisée d'enzymes de dégradation en combinaison avec une force mécanique permet l'entrée de l'hyphe dans la cellule en question sans provoquer de réactions de défense chez la plante. Le champignon produit des exo- et endoglucanases, cellulases, xyloglucanases, et des enzymes pectolytiques telles que les polygalacturonases, qui permettent la pénétration de l'hyphe à travers la paroi cellulaire (Harrison, 1999).

2.3. Développement intraracinaire et formation d'arbuscules

La pénétration du champignon dans l'épiderme de la racine ou des poils absorbants est immédiatement suivie par la colonisation intra- et intercellulaire du cortex par l'hyphe. Le degré de développement des hyphes dans les deux niveaux intra- et intercellulaire varie selon l'espèce de plante hôte et les conditions environnementales (Harrison, 1999).

Le développement intracellulaire du champignon est caractérisé par la production d'une structure à position terminale sur l'hyphe, très ramifiée et connue sous le nom d'arbuscule (Fig. 1.5). Les arbuscules sont produites progressivement à l'intérieur des cellules corticales (Harrison, 1999; Krishna, 2005). L'hyphe ne pénètre pas dans le protoplaste; en revanche, il provoque une forte invagination de la membrane plasmique de la cellule. Ainsi, au bout de deux jours (Bécard & Fortin, 1988), l'arbuscule est bien développé dans le compartiment apoplasique de la cellule corticale (Smith & Read, 2008). La paroi cellulaire des champignons devient progressivement plus mince durant le développement de l'arbuscule. Par conséquent, l'interface d'échange intracellulaire, dans laquelle les deux symbiotes sont en étroit contact, augmente considérablement. Cette interface intracellulaire est considérée comme le site d'échange bidirectionnel des éléments nutritifs entre les deux symbiotes (Harrison, 1999).

Malgré l'importance capitale de l'arbuscule dans l'apport nutritionnel, sa durée de vie se limite à quelques jours, après quoi il dégénère et se dégrade en laissant la cellule végétale intacte et capable d'intégrer un nouvel arbuscule (Cox & Sanders, 1974; Harrison, 1999).

En général, l'initiation, le développement et la disparition de l'arbuscule dure de quatre à quinze jours (Smith & Read, 2008).

Après la formation des arbuscules, certaines espèces de CMA forment des structures sphériques appelées vésicules (Fig. 1.6). Les vésicules sont des gonflements de l'extrémité des hyphes. Elles sont produites à l'intérieur du cortex racinaire et peuvent avoir une position intracellulaire ou intercellulaire selon les espèces de CMA. La variation des conditions environnementales, telle qu'une teneur élevée en phosphate ou une faible intensité lumineuse, affectent le développement des vésicules de la même manière que cela réduit le développement des arbuscules. Les vésicules sont caractérisées par une paroi très épaisse. Leur forme varie selon les espèces de CMA et du milieu où elles sont formées, de globoïde, ovoïde à irrégulière (Smith & Read, 2008). Les vésicules jouent le rôle d'un organe de stockage de réserves lipidiques étant donné qu'elles renferment des quantités abondantes de lipides ainsi que de nombreux noyaux. Cependant, peu de détails sont connus concernant la biologie des vésicules, en particulier leurs mécanisme de germination et la mobilisation des réserves (Smith & Read, 2008).

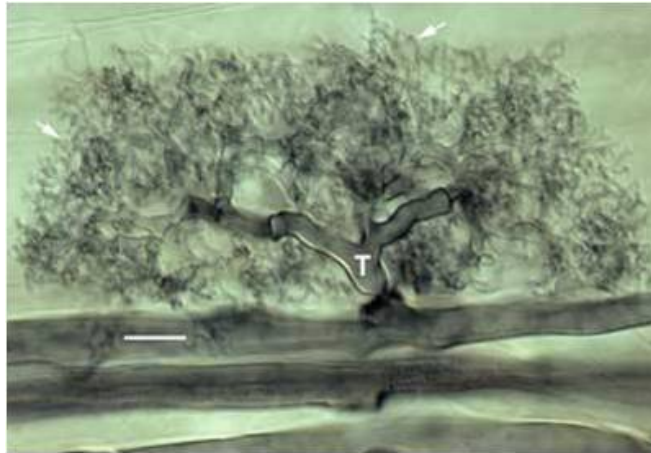


Fig. 1.5 : Arbuscule mature formé dans une racine de poireau (*Allium porrum*). L'arbuscule est formé d'un tronc (T) et de nombreuses branches ramifiées autour (flèches). Échelle = 10 μm . (Brundrett *et al.*, 1984).

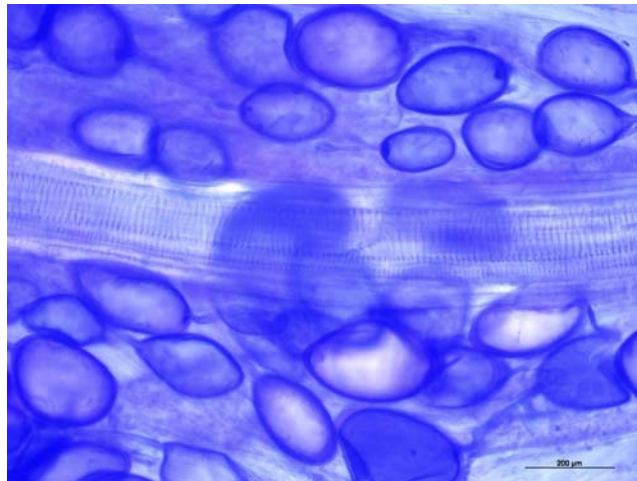


Fig. 1.6 : Vésicules de *G. albidum* produites dans une racine de poireau (*Allium porrum*). La racine contient également de nombreux hyphes intercellulaires. Échelle = 200 μm . (photographie N. Zeramardini).

2.4. Développement extraracinaire du mycélium

Suite à la colonisation du cortex racinaire, la phase extraracinaire prend place. Les hyphes du champignon commencent à se développer très rapidement et intensivement dans le sol (Bécard & Fortin, 1988; Harrison, 1999).

Le mycélium coenocytique externe joue un rôle primordial dans la symbiose. En effet, en se propageant et en colonisant de très grands volumes de sol, le mycélium extraracinaire acquiert des nutriments inaccessibles aux racines et les transfère vers les cellules végétales de la plante hôte. Il permet aussi la colonisation de nouvelles racines de la même plante hôte ou d'autres plantes voisines et produit de nouvelles spores. En plus, le mycélium externe contribue à la stabilité du sol en agglomérant les particules du sol, probablement par l'intermédiaire des glycoprotéines secrétées par les hyphes (Purin & Rillig, 2007).

Le stade exact durant lequel commence le développement externe du mycélium est méconnu. Mosse et Hepper (1975) ont observé une croissance considérable du mycélium immédiatement après la formation de l'appressorium. Par ailleurs, Hepper a confirmé son hypothèse précédente et a aussi observé que le développement du mycélium à l'extérieur de la racine prend parfois place immédiatement après la formation du premier arbuscule dans la cellule corticale (Smith & Read, 2008).

Toutefois, il est probable que le mycélium externe se développe à partir du même hyphe qui a pénétré la racine. Cette stratégie biologique offre au champignon l'avantage d'économiser de l'énergie pour le développement du réseau mycélien à l'extérieur de la racine. De récentes études sur le mycélium externe ont révélé qu'il est formé de deux types d'hyphes, les larges "*runner hyphae*" et les fines branches absorbantes (Juge, 2009).

2.4.1. Les «runner hyphae»

Les *runner hyphae* forment le squelette du réseau mycélien extraracinaire. Ce sont des hyphes d'environ 20 μm de diamètre et ce diamètre augmente au fur et à mesure que le mycélium se développe. Ces hyphes ressemblent aux *runner hyphae* de type germinatif: ils sont longs, droits et caractérisés par une paroi de 1 à 3 μm d'épaisseur. Ces hyphes sont capables de former de nombreuses infections secondaires sur des racines adjacentes de la même plante ou de se développer sur de grandes surfaces dans le sol pour infecter plusieurs racines d'autres plantes de la même espèce ou de plantes d'espèces différentes (Juge, 2009).

2.4.2. Les fines branches «fine branching»

Les fines branches sont des hyphes courts, cloisonnées et à paroi mince (environ 1 μm). Ce sont des hyphes secondaires ramifiées qui poussent suivant un angle droit à partir d'une branche latérale ou des ramifications du «*runner hyphae*». Leurs septa ressemblent à ceux produits par le tube germinatif rétracté (Juge, 2009).

Ces hyphes à paroi mince sont bien adaptés à l'exploitation du sol. Ils ont souvent été retrouvés associés à la matière organique dans le sol où ils prolifèrent pour assimiler les éléments nutritifs (Smith & Read, 2008).

2.5. Sporulation du mycélium extraracinaire

La sporulation du mycélium représente la phase finale du cycle de vie du champignon mycorhizien à arbuscule. Le champignon forme, à partir de ces hyphes somatiques, de larges spores asexuées. Les spores sont des cellules spécialisées qui ne contribuent ni au maintien du développement du champignon ni à l'interaction plante-champignon. Étant donné qu'une spore de CMA peut contenir des centaines, voire des milliers de noyaux (Fig. 1.7), son rôle consiste probablement à maintenir la diversité génétique du champignon. Les spores en germe donnent naissance à de nouveaux individus et elles permettent leur dispersion dans de nouveaux habitats (Morton, 1993).

Puisque les spores sont formées à partir des hyphes, leur production est directement influencée par la physiologie du champignon lui-même (Morton, 1993) et indirectement par des facteurs extrinsèques régulièrement rapporté comme la croissance de la plante hôte, la fertilité du substrat et l'intensité lumineuse (Smith & Read, 2008).

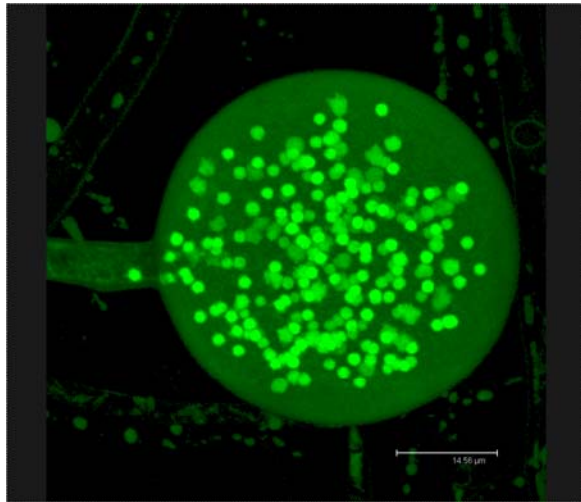


Fig. 1.7 : Spore multinucléée vivante de *G. diaphanum* prise au microscope confocal. Les noyaux dont l'ADN a été coloré par le SytoGreen apparaissent sous forme de points verts. Échelle = 14.56 µm. (Hijri M).

Le système de culture *in vitro* dans des boîtes de Pétri à deux compartiments a été utilisé afin de suivre le développement du mycélium extraracinaire en absence de racines et dans des conditions de croissance variées (St-Arnaud *et al.*, 1996; Villegas & Fortin, 2001). Certains chercheurs ont montré que la présence d'ammonium dans le compartiment distal du milieu de culture réduisait considérablement la production de spores et que le mycélium développait des hyphes enroulés en spirale. À l'opposé, ce phénomène n'a pas été observé en présence de nitrate (Fortin *et al.*, 2002).

Des études similaires ont démontré que l'augmentation de l'acidification du milieu de culture coïncide avec une augmentation de la production de spores sur les fines branches absorbantes (Fortin *et al.*, 2002; Villegas & Fortin, 2002).

Des analyses réalisées sur des plantes annuelles ont montré que la production de spores augmentait avec la maturité des plantes et à la fin de la saison de croissance. Également, les facteurs comme la faible intensité lumineuse et la défoliation, facteurs limitant la photosynthèse et par conséquent la teneur en carbone dans la plante, réduisaient considérablement la sporulation ainsi que la colonisation de nouvelles racines (Smith & Read, 2008).

Le nombre, la forme, la taille, la couleur et l'ornementation de la paroi des spores varient considérablement entre les espèces de CMA d'un même genre (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994). La couleur des spores varie du blanc, au jaune, rouge, brun ou noir, avec toutes les nuances intermédiaires (Fig. 1.8). La taille des spores varie grandement entre les différents genres passant de moins de 50 μm à 500 μm . La forme des spores varie légèrement, de globoïde ou partiellement globoïde à ovoïde (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994).

Toutes ces caractéristiques morphologiques de la spore jouent, jusqu'à présent, un rôle très important dans l'identification, la description et la classification de nouvelles espèces de CMA (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994; Dalpé, 1995).

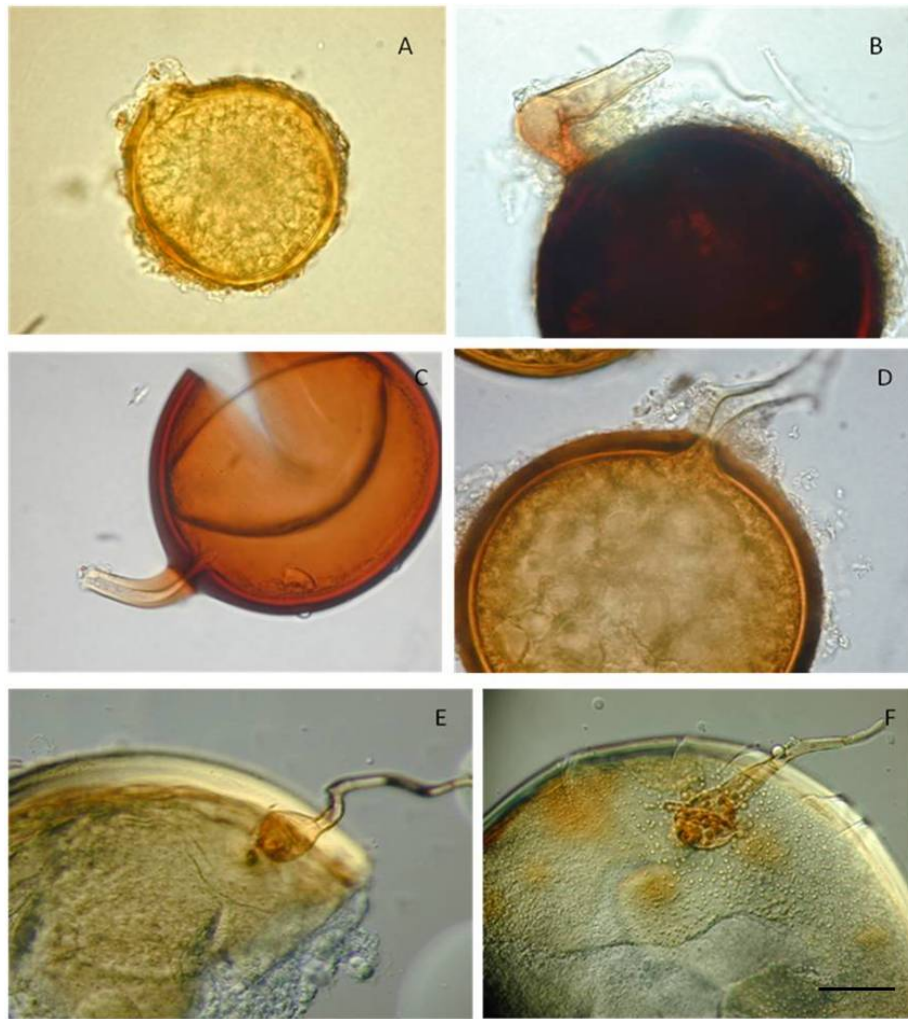


Fig. 1.8 : Variations de la couleur des spores entre des espèces de CMA du même genre et de genres différents. Genre *Glomus* (A, B, C et D), genre *Gigaspora* (E) et genre *Scutellospora* (F). A: *G. mosseae*; B: *G. constrictum*; C: *G. geosporum*; D: *G. kerguelense*; E: *Gigaspora margarita* et F: *Scutellospora gilmorei*. Échelle = 200 μ m. (photographies N. Zeramdini).

Certaines espèces de CMA appartenant à la famille des Gigasporaceae et la famille des Scutellosporaceae forment, en plus des spores, des cellules auxiliaires sur le mycélium extraracinaire. Ces structures sont des vésicules du sol probablement ancestrales. Au début de leur formation, elles apparaissent comme des cellules arrondies et à la maturité, leur surface devient ornementée (Juge, 2009) (Fig. 1.9). La plus importante caractéristique des spores réside dans le fait que les caractères morphologiques des spores de chaque espèce de CMA restent stables dans la majorité des habitats des écosystèmes terrestres (Morton, 1993). La fidélité dans la reproduction représente une indication historique et elle est donc un important outil taxonomique et phylogénétique permettant une meilleure compréhension de la diversité des CMA.

Enfin, mentionnons que ces organismes asexués assurent une variabilité génétique par mutations et anastomoses de leurs hyphes non cloisonnés, permettant ainsi un échange d'information génétique grâce à l'échange de noyaux entre isolats d'une même espèce et de différentes espèces (Smith & Read, 2008).

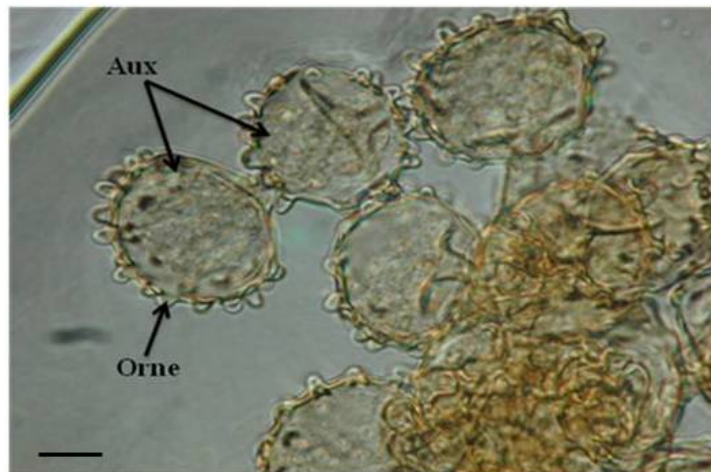


Fig. 1.9 : Cellules auxiliaires (Aux) de *Gigaspora margarita* observées au microscope optique. La surface des cellules auxiliaires est couverte d'ornementations (Orne). Échelle = 200 µm. (photographie N. Zeramdini)

3. Métabolisme et bénéfices des CMA

L'association symbiotique entre les CMA et les plantes est généralement de type mutualiste. Cette relation a un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes.

Vu sa nature de symbiote obligatoire, le CMA acquiert des nutriments de la plante afin de survivre. En échange, la plante bénéficie d'une amélioration de sa nutrition grâce au mycélium extraracinaire du champignon, ce qui se traduit par une meilleure croissance.

Les CMA réduisent aussi l'impact de divers stress abiotiques et biotiques chez la plante hôte, comme le développement des maladies, et modifient même le comportement de certains insectes ravageurs (St-Arnaud & Vujanovic, 2007).

Le transport des nutriments s'effectue à travers une interface spécialisée qui est le résultat d'un développement harmonieux entre les deux symbiotes. Cette interface est composée de la membrane plasmique de chacun des deux partenaires, séparées par un espace apoplasique (Smith *et al.*, 1994).

Le système de culture *in vitro* bi-compartmenté (Fig. 2.1) a eu un rôle particulièrement important dans l'étude de l'absorption des éléments nutritifs et du métabolisme chez le champignon lors de différentes conditions de croissance (St-Arnaud *et al.*, 1996). Il a aussi permis la différenciation entre les métabolismes des mycélia intra- et extraracinaire (Bago *et al.*, 2000).

Le métabolisme du carbone représente un aspect fondamental de la symbiose, en raison des grandes quantités de carbone générées par la symbiose et de son importance dans la croissance des champignons MA (Bago *et al.*, 2000).

Le métabolisme du carbone chez les CMA a été récemment analysé en utilisant un système de culture bi-compartmenté et avec l'isotope naturel ^{13}C combiné à une analyse spectroscopique des racines de plantes non mycorhizées. Cette analyse a révélé que le glucose et le fructose marqués au ^{13}C sont absorbés par le mycélium intraracinaire du champignon sous forme de tréhalose, de glycogène et de lipides (Pfeffer *et al.*, 1999).

Le glucose et le fructose sont transportés des feuilles vers les racines de la plante où ils sont hydrolysés par une invertase racinaire ou par une activité synthétase du saccharose avant d'être assimilés par le champignon (Fortin *et al.*, 2002). Le résultat de l'hydrolyse des sucres représente la principale source de carbone fourni au champignon par la plante hôte (Pfeffer *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 2000).

Par sa capacité d'infecter plusieurs plantes à la fois, le CMA permet le transport du carbone d'une plante à l'autre via le mycélium, ce qui facilite son recyclage en limitant son utilisation par la communauté microbienne du sol (Martins, 1992; Lerat *et al.*, 2002).

Les réserves de C sont stockées sous forme de triacylglycérol durant le cycle de vie du champignon (Bago *et al.*, 2002).

Pendant le développement du champignon, les lipides sont transférés du mycélium intraracinaire vers le mycélium extraracinaire (Bago *et al.*, 2003).

Le champignon joue un rôle important dans l'assimilation des éléments nutritifs peu mobiles tels que le phosphore et le zinc. Ces éléments se fixent facilement sur d'autres substances, ce qui les rend peu mobiles et difficilement accessibles aux racines des plantes (Fortin *et al.*, 2008). Grâce à la capacité de minéralisation du champignon, le phosphate est absorbé sous ses formes organique et inorganique et acheminé vers les racines par les hyphes (Fortin *et al.*, 2002). Le champignon est aussi capable d'assimiler le nitrate et l'ammonium à partir du sol et de les transférer vers la plante (Toussaint *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005).

Les plantes colonisées par les CMA résistent beaucoup plus longtemps aux stress biotiques et abiotiques que celles qui ne le sont pas. En effet, le champignon est capable de développer ses hyphes sur des kilomètres dans le sol et d'assimiler l'eau dans toutes les particules du sol qui ne sont pas accessibles à la plante. Il est également capable de lancer un signal à la plante assurant une fermeture très rapide des stomates (Fortin *et al.*, 2002).

Enfin, les CMA sont aussi connus pour leur capacité de réduire les symptômes de la maladie chez les plantes et la population des agents pathogènes du sol tels que *Fusarium oxysporum* (St-Arnaud *et al.*, 1995a; Yergeau *et al.*, 2006) et *Pythium ultimum* (St-Arnaud *et al.*, 1994) par le biais de mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés (St-Arnaud *et al.*, 1995a, b). Les deux principaux mécanismes sont probablement le déclenchement des réactions de défense des plantes suite à la signalisation impliquée dans l'autorégulation de la symbiose et la modification des communautés microbiennes de la mycorrhizosphère créant ainsi des conditions défavorables pour l'installation des organismes pathogènes (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; St-Arnaud & Vujanovic, 2007).

4. Histoire évolutive des CMA

Des spores fossiles ressemblant à celles des CMA ont été trouvées dans des spécimens de l'ère du Silurien, qui s'étend de la fin de l'Ordovicien (environ 450 millions d'années) jusqu'au début du Dévonien (410 millions d'années). Cependant, certains chercheurs ont mis en doute la crédibilité de cette hypothèse, car ces échantillons de spores fossiles pourraient être le résultat d'une contamination à partir de spores d'autres microorganismes ou celles des plantes de la flore du Rhynie chert (Smith & Read, 2008).

Une récente recherche dans le Rhynie a révélé la présence d'arbuscules fossiles conservés dans les stèles d'un spécimen végétal appelé *Aglaophyton major*. Cette découverte suggère que la symbiose mycorhizienne a été probablement établie au début du Dévonien, il y a environ 400 millions d'années et que les champignons mycorhiziens à arbuscules ont évolués avec les premières plantes colonisant les écosystèmes terrestres (Remy *et al.*, 1994).

Les arbuscules retrouvés dans *Aglaophyton major* (semblable à celles observées dans les bryophytes et les plantes vasculaires), sont des structures fines composées d'un tronc basal avec des branches secondaires ramifiées, très fines (de 1 à 2 μm de diamètre) (Taylor *et al.*, 1995). Ces arbuscules fossiles ressemblent à ceux des CMA actuels; par contre, ils sont différents de ceux retrouvés dans l'Antarctique du Triasique, qui sont moins ramifiés et plus robustes. L'analyse approfondie de ces fossiles a révélé qu'ils sont aussi caractérisés par des hyphes extraracinaires, non septés et dont le diamètre varie de 3 à 5 μm (Remy *et al.*, 1994). En plus, des spores sont produites latéralement sur les hyphes et elles sont caractérisées par une forme globuleuse, un diamètre de 40 à 95 μm et une paroi membranaire composée de plusieurs couches (Taylor *et al.*, 1995). Les caractéristiques morphologiques des structures retrouvées dans les fossiles sont semblables à ceux des CMA de type *Glomus* Tulasne & Tulasne (Pirozynski & Dalpé, 1989).

La colonisation des terres par les plantes aurait eu lieu à la fin du Silurien (environ 450 millions d'années). Cependant, les études récentes suggèrent que l'apparition des plantes a eu lieu un peu plus tard, probablement au début du Dévonien (environ 400 millions d'années) (Remy *et al.*, 1994).

Selon ces spéculations, il semblerait que la colonisation du milieu terrestre par les plantes est le résultat direct de la création d'une symbiose mycorhizienne. Ainsi, la découverte des

arbuscules fossiles du *Rhynie chert* a permis de déterminer approximativement la date et l'origine de vie végétale sur la terre (Remy *et al.*, 1994).

5. Systématique des champignons endomycorhiziens arbusculaires

Durant plusieurs décennies, les interactions biologiques qui forment les écosystèmes, ont suscité l'attention des chercheurs en biologie végétale. La compréhension de ces unions biologiques, telle que la symbiose mycorhizienne, requiert des connaissances de leurs composantes végétales, fongiques et telluriques. Aussi des connaissances concernant leur systématique, permet d'étudier la biodiversité, la taxonomie et les relations phylogénétiques de ces organismes.

L'étude de la systématique des CMA se base sur les caractères morphologiques, ontogéniques, les affinités phylogénétiques, physiologiques et la paléontologie. Cependant, les caractères morphologiques, le mode de vie (biotrophes obligatoire) et l'absence de reproduction sexuée, limitent leur utilisation en systématique conventionnelle. L'apport de nouvelles disciplines telles que la biochimie, la microscopie électronique et la biologie moléculaire ont contribué à l'amélioration de la taxonomie des CMA (Dalpé, 1995).

La présence des CMA dans les écosystèmes est importante pour assurer la biodiversité des plantes et de la flore microbienne du sol. Dès lors, l'identification et la compréhension de la biologie des CMA est nécessaire pour leur utilisation et leur gestion en agriculture afin de réduire l'utilisation des fertilisants chimiques et de protéger l'environnement (Beauregard *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces disciplines vise à renforcer les connaissances taxonomiques, culturelles et environnementales des CMA. La classification des CMA a connu la succession de deux périodes différentes: soit la période sporocarpique de 1845 à 1968 et la période pariétale de 1968 jusqu'à aujourd'hui (Dalpé, 1995). En fait, en 1845, avec la découverte de masses sporocarpiques dans le sol, les frères Tulasne furent les premiers à décrire deux espèces de CMA sporocarpiques et hypogées, *Endogone macrocarpum* (*Glomus*) et *Endogone microcarpum* (Koide & Mosse, 2004). Ces deux espèces ont été réorganisées dans la famille des Endogonacées par Bucholtz en 1912. En 1922, Thaxter avait découvert deux types de spores chez les Endogonacées : les zygosporées sexuées formées à la suite de la

fusion de deux gamétanges et les chlamydospores asexuées, qui sont des spores de conservation à paroi épaisse et différenciées en position apicale sur l'hyphe (Dalpé, 1995; Koide & Mosse, 2004). Ainsi, le caractère commun à tous les Endogonacées est devenu la présence de sporocarpe. En 1968, Nicolson et Gerdemann réorganisent le genre *Endogone* et y incluent les espèces non sporocarpiques.

Étant donné que les seules structures disponibles pour la classification étaient les spores isolées, la morphologie de la paroi sporale codée sous forme de murographe a suscité beaucoup d'intérêt de la part des taxonomistes. Ainsi, vers le début des années 1970, Gerdemann et Trappe ont proposé une nouvelle classification basée sur l'hypothèse que les espèces à spores morphologiquement similaires sont apparentées phylogénétiquement. Ils ont alors regroupé les espèces sporocarpiques à chlamydospores dans le genre *Glomus* et ont décrit deux nouveaux genres renfermant les espèces azygosporiques et non sporocarpiques : le genre *Gigaspora* dont les spores possèdent un hyphe suspenseur bulbeux et le genre *Acaulospora* dont les spores ont une position intercalaire ou latérale sur l'hyphe (Trappe & Gerdemann, 1979).

Par la suite, deux nouveaux genres ont été décrits. Le genre *Entrophospora*, apparenté au genre *Acaulospora*, a été décrit afin de différencier la position de la spore sur l'hyphe (Ames & Schneider, 1979), et le genre *Scutellospora* qui fut créé pour le différencier du genre *Gigaspora* par la présence d'un bouclier de germination dans la spore (Walker & Sanders, 1986; Dalpé, 1995; Koide & Mosse, 2004). Les cinq nouveaux genres ont été regroupés dans la famille Endogonacées de l'ordre des Endogonales. Ce dernier appartient au phylum polyphylétique des Zygomycètes (Schüssler *et al.*, 2001a; Koide & Mosse, 2004).

En 1990, Morton et Benny ont classés les cinq genres en trois familles : Glomaceae, Acaulosporaceae et Gigasporaceae, réparties à leur tour en deux sous-ordres : Glomineae et Gigasporineae, qui furent créés afin de différencier respectivement les espèces produisant des vésicules et celles n'en produisant pas. L'ensemble fut classé dans un seul ordre nommé Glomales (Morton & Benny, 1990; Koide & Mosse, 2004).

La caractérisation ultrastructurale des parois sporales fait souvent défaut dans la description des espèces et les taxonomistes avaient le devoir d'examiner régulièrement les structures pariétales afin de confirmer avec exactitude leurs observations en microscopie optique.

Plusieurs d'entre eux ont trouvé que la classification basée sur la description morphologique n'est pas toujours évidente (Koske, 1986). De plus, certains ont supposé que le nombre de couches formant la paroi sporale dépendrait de l'âge de la spore et de la méthode utilisée pour son extraction à partir du sol (Rosendahl, 2008).

Par conséquent, plusieurs approches ont été développées afin de faciliter l'identification des différences significatives au niveau de l'espèce, de la population fongique et même par rapport à d'autres organismes (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994).

L'utilisation des microscopes électroniques à transmission et à balayage comme outil taxonomique a permis l'observation du processus biologique de la germination des spores, de l'ontogénie des parois (Maia *et al.*, 1993) et de l'architecture des composants des parois de la spore et de l'hyphe (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994). Des tests d'immunofluorescence ont mis en évidence une réponse spécifique chez les Glomaceae, différente de celle détectée chez les Gigasporaceae et les Acaulosporaceae (Dalpé, 1995). Des méthodes sensibles, telles que les techniques électrophorétiques et immunologiques, utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont permis la reconnaissance de différents symbiotes difficilement identifiables par leur morphologie (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994). Des tests sérologiques utilisant les anticorps fluorescents et les tests ELISA appliqués pour identifier les différences entre les espèces CMA, ont révélé une étroite parenté entre les genres *Glomus* et *Sclerocystis* et entre les genres *Acaulospora* et *Gigaspora* (Aldwell & Hall, 1987). Malgré tous ces efforts, l'utilisation de ces techniques raffinées reste limitée puisqu'elles ne permettent pas une application à grande échelle (Rosendahl *et al.*, 1989).

Avec le développement d'outils moléculaires, une alternative s'est présentée aux taxonomistes afin d'étudier de manière plus approfondie la variabilité génétique et les relations phylogénétiques au sein des Glomales. Ces approches permettent aussi d'obtenir des marqueurs moléculaires spécifiques pour l'identification rapide des champignons dans le tissu de la plante hôte et dans le sol. On peut considérer que l'analyse phylogénétique basée sur des outils moléculaires est relativement récente. En effet, une étude moléculaire basée sur les séquences nucléotidiques du gène de la petite sous-unité ribosomale 18S (18 SSU rRNA) a montré il y a plus d'une quinzaine d'années que les Glomales forment un clade distinct des autres champignons et qu'ils ont divergé un peu avant les Ascomycota et

les Basidiomycota, il y a environ 400 millions d'années (Simon *et al.*, 1993a). Des amorces spécifiques ont également été générées à partir de marqueurs RADP (Lanfranco *et al.*, 1995).

Une analyse phylogénétique beaucoup plus récente basée sur les séquences nucléotidiques du gène 18S codant pour l'ARN ribosomal a montré que ces organismes possèdent une signature moléculaire et des caractéristiques morphologiques et écologiques catégoriquement différentes de celles des autres embranchements du règne fongique. En conséquence, le groupe des CMA a été retiré du phylum polyphylétique Zygomycota et classé dans un nouveau phylum monophylétique appelé Glomeromycota (Schüssler *et al.*, 2001a) (Fig. 1.10). Cette classification est cependant actuellement contestée et il semblerait que les CMA appartiennent bien au groupe paraphylétique des Zygomycota (Lang & Hijri, 2009; Lee & Young, 2009).

Deux nouveaux clades ancestraux d'espèces de CMA ont été découverts selon une analyse comparative de séquences d'ARN ribosomal divergentes. Ils ont été classés dans deux nouvelles familles: Archaeosporaceae et Paraglomaceae. En dépit des similitudes morphologiques des espèces mycorhiziennes et des similitudes des profils d'acides gras, chaque famille est phylogénétiquement éloignée de l'autre et des autres familles des Glomales (Morton & Redecker, 2001). Jusqu'à présent, chaque famille est composée d'un seul genre. Le genre *Archaeospora* de la famille des Archaeosporaceae comprend trois espèces formant des spores à saccule sporifère typique du genre *Acaulospora*. Deux de ces espèces sont dimorphiques et forment des spores de type *Acaulospora* et de type *Glomus*. Le genre *Paraglomus* de la famille des Paraglomaceae se compose de deux espèces formant des spores similaires à celles du genre *Glomus*, mais différenciées de ce dernier par leurs séquences nucléotidiques uniques de l'ARNr 18S (Morton & Redecker, 2001). Le champignon *Geosiphon pyriformis*, le seul endosymbiote qui forme une association avec la cyanobactérie *Nostoc punctiforme*, a été inclus dans le phylum Glomeromycota mais dans une nouvelle famille : *Geosiphonaceae* de l'ordre des Archaeosporales, en se basant sur l'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques du gène de 18S de l'ARNr (Schüssler, 2002). Cependant, cette dernière classification est controversée car *Geosiphon* ne serait pas un CMA.

La famille des *Archaeosporaceae* a connu sa part de modifications au fil des années. Le genre *Intraspora*, renfermant les espèces dont la paroi des spores réagit au Tryptan Bleu, s'est ajouté à la famille des *Archaeosporaceae* auprès du genre *Archaeospora* (Sieverding & Oehl, 2006). Par ailleurs, le genre *Appendicispora*, avec ses parois sporales composées de trois couches au lieu de deux, d'une structure de germination et d'un pédicelle qui forme le lien de la spore avec l'hyphe rejoint également la famille des *Archaeosporaceae* (Spain *et al.*, 2006). De même, la famille *Acaulosporaceae* a connu la création d'un nouveau genre, *Kuklospora*, dont les espèces possèdent une signature moléculaire différente de celles des espèces du genre *Entrophospora* (Sieverding & Oehl, 2006).

Actuellement, le phylum Glomeromycota comporte quatre ordres : *Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales* et *Archaeosporales*, huit familles et treize genres. Le nombre exact d'espèces identifiées et classées dans le phylum Glomeromycota n'est pas connu. Si l'on considère qu'environ 10% de la flore fongique mondiale est décrite, on peut supposer qu'il reste de nombreuses espèces à répertorier (Rosendahl & Matzen, 2008). Certains auteurs estiment que les CMA comptent environ 200 espèces et qu'il existe environ 104 espèces décrites dans le genre *Glomus* à lui seul. Pour certaines espèces, il existe des descriptions synonymes, ce qui rend difficile la détermination du nombre exact d'espèces de CMA. En réalité, plusieurs spécimen d'herbier sont en mauvais état et ne permettent plus les descriptions taxonomiques et les études moléculaires (Rosendahl & Matzen, 2008).

Les données moléculaires ont changé considérablement la taxonomie des CMA, bien que la majorité des marqueurs moléculaires disponibles actuellement ne concernent que des gènes ribosomaux hautement polymorphes (Hijri *et al.*, 1999). La structure multi-génomique très particulière et unique chez ces champignons (Kuhn *et al.*, 2001; Hijri & Sanders, 2005) rend leur utilisation plus difficile et encore moins fiable. Ainsi, l'utilisation de nouveaux gènes, tels que les gènes de la tubuline, pour le développement de nouveaux marqueurs moléculaires serait une bonne alternative à explorer.

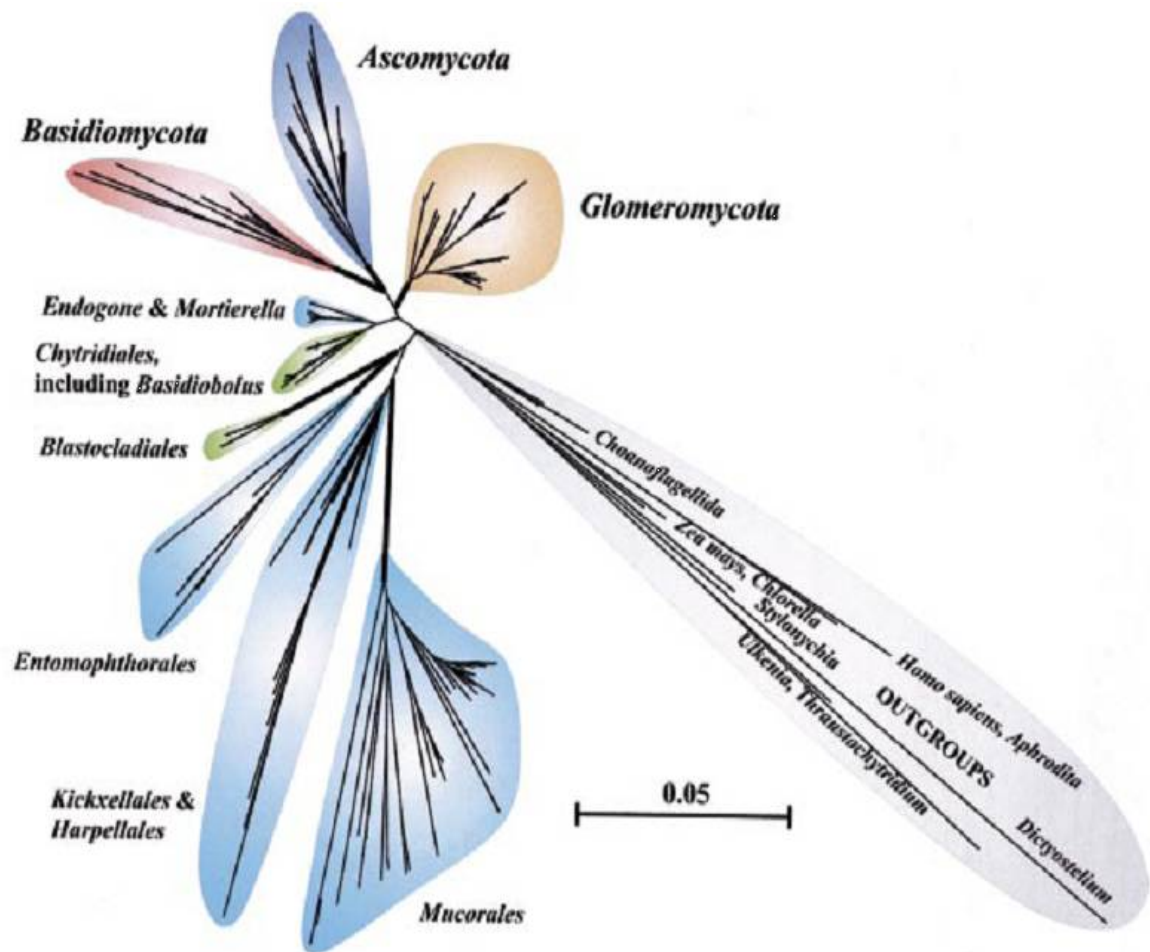


Fig. 1.10 : Analyse phylogénétique des CMA basée sur les séquences nucléotidiques du gène 18S de l'ARNr. Les CMA (Glomeromycota) formeraient un phylum monophylétique complètement séparé des Endogone (Zygomycota) (Schüssler *et al.*, 2001a).

6. Conclusion

Les CMA sont reconnus depuis longtemps comme des symbiotes importants pour la majorité des plantes vasculaires terrestres. Depuis que Barbara Mosse a montré l'effet d'un CMA sur un plant de fraise (Mosse, 1956), leurs effets bénéfiques sur la croissance et sur la survie des plantes ont été clairement démontrés (Dalpé, 1995). Les CMA peuvent également réduire l'incidence des maladies chez la plante hôte (St-Arnaud *et al.*, 1995a; St-Arnaud & Vujanovic, 2007). Les endomycorhizes sont l'une des rares associations plante-champignon retrouvée sous forme de fossiles et certains chercheurs suggèrent même qu'elles ont facilité l'apparition des premières plantes sur le milieu terrestre (Simon, 1995). L'amélioration de la qualité des sols aussi bien agricoles que naturels ne cesse d'être l'objet de nombreux travaux de recherche. L'étude et l'identification des CMA monopolise un grand intérêt et touche à plusieurs disciplines aussi bien la morphologie, la physiologie, l'écologiques que la biologie moléculaire, puisque champignons, plantes et sols interagissent ensemble pendant l'association symbiotique.

L'identification des CMA par le biais de la caractérisation morphologique ou par des techniques d'identification moléculaire permettra une meilleure gestion écologique des milieux naturels et des milieux exploités en agriculture, par la réduction des apports en engrais chimiques et en pesticides. Cela limitera les effets néfastes de certaines pratiques agricoles sur l'environnement, en particulier l'eau et favorisera le développement durable (Beauregard *et al.*, 2008).

La systématique des CMA suscite à l'heure actuelle plusieurs controverses entre les approches d'identification morphologiques traditionnelles et l'approche moléculaire.

L'étude moléculaire des champignons vient, dans certains cas, confirmer la classification morphologique et parfois contredire cette dernière. Elle permet l'identification de la communauté fongique dans le sol et à l'intérieur des plantes vivantes.

Finalement, les mycologues et les biologistes moléculaires doivent coordonner les approches de leurs recherches pour servir le même objectif: celui de comprendre et d'appliquer ces connaissances pour améliorer les pratiques agricoles et préserver l'environnement.

Chapitre 2

Study of intra- and inter-specific polymorphism of the β -tubulin gene among arbuscular mycorrhizal fungal species in order to develop molecular markers

Nadia Zeramdini, Marc St-Arnaud et Mohamed Hijri

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Université de
Montréal, 4101 Sherbrooke Est, Montréal, Qc, Canada, H1X 2B2

Résumé

Afin de développer des marqueurs moléculaires pour le gène β -tubuline, nous avons étudié le polymorphisme intra-et inter-spécifique dans cinq espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Le gène β -tubuline a été cloné et séquencé à partir de l'ADN génomique de cinq espèces de *Glomus*. L'analyse du polymorphisme intra-spécifique indique clairement un polymorphisme génétique du gène β -tubuline dans *G. aggregatum*, *G. cerebriforme* et *G. fasciculatum*. En effet, deux séquences paralogues très variables ont été identifiées chez ces espèces. Cependant, les séquences du gène β -tubuline de *G. clarum* et *G. etunicatum* montrent une homogénéité et l'absence de polymorphisme intra-spécifique. Toutes les séquences du gène β -tubuline montrent la présence de deux introns, très variables et situés dans la même position dans toutes les espèces de CMA. La majorité des substitutions sont situées dans les régions codantes et sont synonymes. L'action de la sélection négative sur le gène β -tubuline des CMA suggère que le gène β -tubuline a peu ou pas évolué depuis l'apparition des CMA. Une analyse phylogénétique de 21 séquences du gène β -tubuline a révélé que les Glomaceae forment un groupe monophylétique très soutenu avec les Acaulosporaceae et Gigasporaceae comme groupes frères. Les séquences paralogues nouvellement identifiées ne sont pas monophylétiques au sein de chaque espèce. Les marqueurs moléculaires ont été conçus à partir des régions conservées et variables du gène β -tubuline. Des bandes de tailles spécifiques (401 pb) ont été obtenues avec succès auprès des paralogues de *G. cerebriforme*. Deux paires d'amorces, β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R et β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R, ont permis d'identifier cinq séquences β -tubuline du groupe Tub.1. Une paire d'amorces, β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R, nous a permis d'identifier seulement deux séquences β -tubuline du groupe Tub.2 ainsi que six autres séquences utilisées comme contrôles négatifs.

Nos résultats montrent que le gène β -tubuline seul ne permet pas le développement de marqueurs moléculaires permettant l'identification spécifique des espèces de CMA. Nous suggérons que l'utilisation combinée de plusieurs gènes permettra le développement de marqueurs moléculaires spécifiques ainsi qu'une meilleure compréhension de la phylogénie des CMA.

Mots-clés: AMF, mycorhizes à arbuscules, β -tubuline, intra- et inter-spécifique polymorphisme, marqueurs moléculaires, identification.

Abstract

To obtain β -tubulin sequence data for molecular marker design, we assess intra- and inter-specific polymorphisms within five arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) species. β -tubulin genes were cloned and sequenced from genomic DNA of five *Glomus* species. Intra-specific polymorphism analyses clearly indicate a high genetic polymorphism of the β -tubulin gene in *G. aggregatum*, *G. cerebriforme* and *G. fasciculatum*. In addition, two highly variable β -tubulin paralogs were newly identified in these species. However, *G. clarum* and *G. etunicatum* showed sequence homogeneity and the absence of intra-specific polymorphism. All AMF sequences show the presence of two introns, which were highly variable and located in the same position in all glomeromycotan species. The majorities of substitutions were located in the coding regions and were mostly synonymous. The purifying acts on the β -tubulin gene in AMF suggesting that the β -tubulin gene has little or no change since the appearance of AMF. A phylogenetic analysis carried out for 21 β -tubulin sequences revealed that the Glomeraceae sequences form a highly supported monophyletic group with Acaulosporaceae and Gigasporaceae as sister-groups. The newly identified paralog sequences were not found to be monophyletic within each species. Molecular markers were designed in the conserved and variable β -tubulin regions. Specific bands with the expected size of 401 bp were successfully obtained for *G. cerebriforme* paralogs. Two pairs of primers, β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R and β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R have identified five β -tubulin sequences of Tub.1 group. A pair of primer, β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R, allows us to identify only two β -tubulin sequences of Tub.2 group and six other sequences used as negative controls. Our results show that the β -tubulin gene alone did not allow the design of molecular markers for specific AMF species identification. We suggest that the combination of many genes will allow the designing of specific molecular markers and a best comprehension of AMF phylogeny.

Keywords: AMF, arbuscular mycorrhiza, β -tubulin gene, intra- and inter-specific polymorphism, molecular markers, identification.

1. Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate biotrophic root symbionts of most plants and are determinants of diversity in ecosystems, by modifying the structure and functioning of plant communities (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994; Van Der Heijden *et al.*, 1998). AMF are an ancient group of fungi that have been found in the early Devonian plants that colonized land over 400 million years ago (Remy *et al.*, 1994; Berbee & Taylor, 2007). They offer a variety of benefits to their host, including improved phosphate and water uptake, drought tolerance and resistance to root pathogens (Smith & Read, 2008). The AMF were divided into five families (Glomaceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae, Archaeosporaceae and Paraglomaceae) and two suborders (the Glomineae and the Gigasporineae), both of which were previously placed in a new order the Glomales of the phylum Zygomycota (Morton & Benny, 1990; Morton & Redecker, 2001). Schüssler *et al.* (2001) used ribosomal gene data to establish the relationships among AMF and between AMF and other fungi. The AMF group was elevated to the level of phylum, Glomeromycota. The Glomeromycota were shown to be monophyletic and to form a sister group with the Dikarya (Ascomycota and Basidiomycota) (Schüssler *et al.*, 2001a), while the Zygomycota were shown to be polyphyletic. The monophyly of the Glomeromycota has been supported by later studies. The amino acid sequences of actin and elongation factor 1- α (EF-1 α) provided good support for the monophyly of the Glomeromycota and suggested a relationship with the Mortierellales (Helgason *et al.*, 2003). Analysis of α - and β -tubulin protein sequences showed similarity between glomeromycotan sequences and those of chytrids (Corradi *et al.*, 2004a). Recently, phylogenetic analysis based on *Glomus* mitochondrial encoding protein sequences suggested that AMF are not a sister taxon of Dikarya and that they belong instead to one of the lineages of the polyphyletic Zygomycota phylum (Lang & Hijri, 2009; Lee & Young, 2009).

AMF have traditionally been identified through their spore's morphology. Indeed, families and genus of AMF were mainly distinguished by the mode of formation of the spores and their hyphal attachment. In addition, researchers have shown that the sub-layers of the spore wall represent one of the most useful morphological characters used in AMF identification (Walker, 1983; Walker, 1986; Walker & Sanders, 1986; Morton & Benny, 1990). Until now, approximately 200 AMF species have been described based on the

morphological features of spores (Morton & Benny, 1990; Dalpé, 1995; Helgason *et al.*, 2002; Redecker & Raab, 2006; Rosendahl, 2008).

However, spore morphology does not fully reflect AMF diversity since all structural components of spores are susceptible to alteration or deterioration by a wide range of biotic and abiotic agents in the soil environment (Morton, 1993; Redecker, 2002). For example, field-collected spores are often parasitized or degraded and therefore unidentifiable (Redecker *et al.*, 2003).

Even the identification of healthy spores may pose problems because morphological characters are scarce in some AMF species. Another limitation of morphological identification is the dimorphism of some AMF species (e.g. *Archaeospora leptoticha*, *Glomus dimorphicum*) (Redecker *et al.*, 2003). In the absence of spores, the intraradical structures allow identification only to the family level (Merryweather & Fitter, 1998). Several lineages of AMF that do not stain at all within the roots or stained slightly with the standard dyes have been discovered (Morton & Redecker, 2001).

Several techniques have been tried to develop identification approaches independent of the spore formation. For example, isozymes-based techniques were developed to distinguish between morpho-species and to identify isolates of many organisms including AMF (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994). Serological tests such as fluorescent antibodies and Enzymes Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) have also been applied to identify differences between AMF species *in-planta* (Aldwell & Hall, 1987). However, such techniques do not easily identify the species and are not appropriate for large-scale applications (Rosendahl *et al.*, 1989).

Most AMF identification techniques are based on DNA sequences. These techniques do not have problems with gene expression because the genotypes are analyzed directly. Phylogenetic analyses based on DNA sequences allow direct conclusions about the evolutionary history and the relationship of the AMF taxa.

Most of molecular identification studies are based on the ribosomal genes. The first three 18S Small Subunit (SSU) sequences from ribosomal DNA of these fungi were determined by Simon *et al.* (1992). The authors designed a specific PCR primer for AMF: VANS1. Other group-specific primers for lineages of AMF were also designed (Simon *et al.*, 1993b). The VANS1 was used in some subsequent studies (Clapp *et al.*, 1995; Di Bonito *et*

al., 1995; Redecker *et al.*, 2000a), but the availability of more SSU sequences showed that the VANS1 priming site is not well-conserved in all groups of the AMF (Redecker *et al.*, 2000a) and is not specific for the Glomales (Schüssler *et al.*, 2001b). The 28S Large Ribosomal Subunit (LSU) has also been widely used by other authors. Specific primers targeting the highly polymorphic domains D1 and D2 of the LSU were designed, each for a different AMF species (Van Tuinen *et al.*, 1998). Helgason *et al.* (1998) designed a specific primer pair (AM1-NS31) targeted at a region of the SSU to amplify AMF communities in roots and exclude plant DNA sequences. A group of specific primers were also designed for five major phylogenetic lineage of AMF to amplify the variable ITS domains (Redecker, 2000).

As shown above, the majority of the authors have targeted parts of the ribosomal genes for molecular identification. These genes are available in high copy number in AMF genome (Redecker *et al.*, 2003) and are extremely polymorphic even within single spores of an AMF isolates (Sanders *et al.*, 1995; Hosny *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2004). This organization is unique in AMF and differs from all other fungi, in which ribosomal DNA sequences (ITS and IGS) are often identical within a species (Redecker *et al.*, 2003). Variability within this gene does not allow separating closely related species or isolates of the same species.

In contrast to ribosomal genes, the β -tubulin gene is present at low copies numbers in the genome and has high molecular variability, suggesting that the β -tubulin gene might be useful to develop molecular markers (Corradi *et al.*, 2004a, b). However, analysis of genetic variability of β -tubulin sequences of Glomeromycota was poorly investigated in comparison to other fungal phyla.

In the present study we report the isolation of β -tubulin sequences from five AMF species. AMF β -tubulin sequences were analysed to determine the presence of intra-specific genetic polymorphism and to identify the presence of paralogs. Phylogenetic analysis was carried out to determine the segregation of taxa. Molecular markers were developed to allow AMF identification in soil and plant-roots.

2. Materials and methods

2.1. Fungal material

Isolates of *G. aggregatum* (strain GC_9), *G. clarum* (DAOM 234179), *G. cerebriforme* (DAOM 227022) and *G. fasciculatum* (strain 3543_rac) were obtained from the Glomeromycota *in vitro* Collection (GINCO) at the Eastern Cereal and Oil seed Research Centre (CRECO), Ottawa, Canada. Spores of each isolate were cultured *in vitro* with actively growing Ri T-DNA transformed *Daucus carota* roots (Bécard & Fortin, 1988) in a Petri plates containing minimal medium (M) as described earlier (Bécard & Piché, 1992) and solidified with 0.4% gellan gum (Gelgro; Sigma Aldrich, Inc, Canada) (St-Arnaud *et al.*, 1996). When a new mycorrhizal association was observed, the culture was transferred and maintained in two-compartment Petri dishes (100 x 15mm) to allow production of large amounts of viable spores and hyphae in the distal compartment free of roots (St-Arnaud *et al.*, 1996) (Fig. 2.1). The Petri dishes were kept in an incubator at 25°C until the spores were collected for DNA extraction.

An isolate of *G. etunicatum* (NPI) was obtained in soil samples from ‘Native Plants Incorporated’ (UK) in a clay-like growth substrate and kept at 4°C until isolation of the spores.

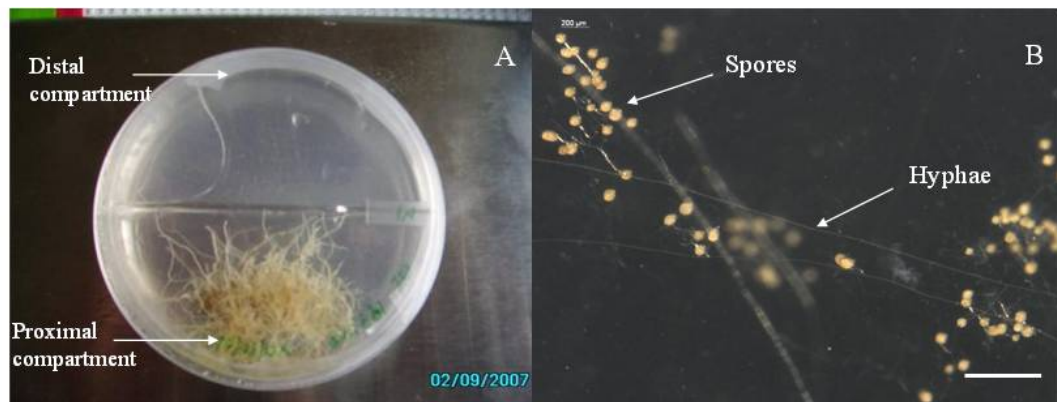


Fig. 2.1: A; The *in vitro* compartmentalized system showing carrot roots growing in a proximal compartment while the fungus producing spores grows in the distal compartment. B; close up of the distal compartment showing higher density of spores and hyphae of *G. intraradices* 197198. Bar = 200 μm. (photography N. Zeramdini).

2.2. DNA extraction

Approximately 200 spores with hyphal fragments attached were collected from the four AMF species maintained *in vitro* by dissolving the gel medium in a 10 mM citrate buffer solution (Bécard & Piché, 1992), pH 6 and 30°C.

Spores of the *G. etunicatum* isolate NPI previously grown in pot cultures were recovered from the growth substrate. A 100-g soil sample was washed under tap water through a series of sieved ranging from 150 to 32 µm mesh. The resulting spore samples with the accompanying debris were centrifuged in a 50% sucrose solution to remove debris and dead spores and to recover healthy spores in the supernatant. All healthy-looking spores (~200 spores) of *G. etunicatum* were collected using a dissection microscope.

The freshly collected fungal material was placed in 2 ml microcentrifuge tubes containing a matrix of ceramic beads and grinded using a FastPrep apparatus (Bio 101) for 30 s at 4000 rpm, repeated three times. The total genomic DNA was then extracted from the resulting suspensions using the DNeasy plant MiniKit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. DNA concentration was estimated using a PicoGreen quantification kit (Invitrogen) on a spectrofluorimeter (Bio Photometer, Eppendorf). Genomic DNA quality was measured by electrophoresis on a 1% agarose gel.

2.3. Amplification of the β -tubulin gene

β -tubulin genes were amplified from DNA samples using the following primer sets : β .Tub.F 5'-GCT GTT CTC GTT GAC CTT GA-3' and β .Tub.R 5'-GCA AAT CCG ACC ATG AAG AA-3'. These primers were designed using conserved regions obtained with degenerate primers and were shown to be useful for amplifying these genes in all AMF genera tested so far (Corradi *et al.*, 2004a).

The PCR reactions were carried out in 20 µl volumes containing 1X *Pfu* buffer with MgSO₄ 1X, 50 µM dNTPs, 5 µM of each primer and 0.5 U of *Pfu* polymerase (Fermentas). The PCR reactions were performed in a Mastercycler ep S gradient thermocycler (Eppendorf, NY, USA) with the following cycling conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56 °C

for 40 s, and extension at 72 °C for 2 min. A final extension step of 10 min at 72°C was ended with a wait period at 4°C. Amplification products were electrophoretically separated on 1% agarose gels (Fig. 2.2).

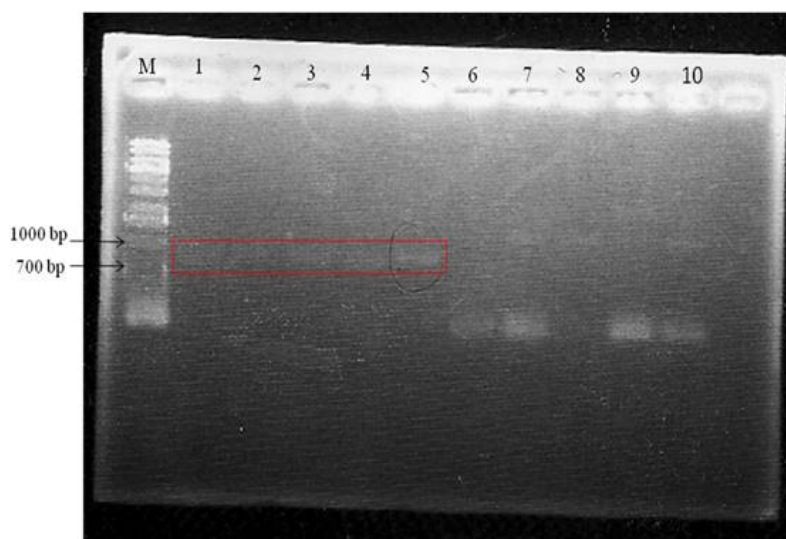


Fig. 2.2: Agarose gel (1%) electrophoresis of amplified β -tubulin gene using the β .Tub.F/ β .Tub.R primers. Lane 1-5, amplification product of β -tubulin gene; lane 1: *G. etunicatum*; lane 2, *G. aggregatum*; lane 3, *G. fasciculatum*; lane 4, *G. cerebriforme* and lane 5, *G. clarum*. Lane 6-10, amplification product of α -tubulin gene. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder).

2.4. Cloning and sequencing

Gene Jet Cloning kit (Fermentas) was used for cloning the PCR products. Unpurified PCR products were ligated 30 min with pJET1/Blunt (50 ng / μ l) following the manufacturer's instructions. A 100 μ l suspension of *Escherichia coli* (α DH5) cells was mixed with 10 μ l of ligation products and the transformation was achieved by a 2 min heat-shock at 42°C. The bacterial cells were recovered in 250 μ l SOC medium by shaking at 200 rpm for 1 h at 37°C and then plated out on a Luria-Bertani Broth medium containing 100 μ g/ml of ampicillin, 0.1 M of IPTG and 0.1 M of X-Gal. The plates were incubated at 37°C overnight.

2.5. Screening positive transformants by PCR

The blue/white color screening technique was used to select for transformed colonies. All white transformants were simultaneously screened further by direct colony PCR and replated on duplicate Petri dishes. The cloned inserts were reamplified with primers: β .Tub.F/ β .Tub.R.

PCR conditions were similar to those described previously, except that *Taq* polymerase (Fermentas) was used instead of *Pfu* polymerase (Fermentas). Amplification products were electrophoretically separated on 1% agarose gels. Positive colonies were inoculated in 5 ml of liquid LB media containing ampicillin and grown overnight at 37°C. Recombinant plasmids DNA containing the insert were isolated and purified from the liquid cultures using Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

Plasmids were sequenced with pJET1.F/pJET1.R primers provided in the Gene Jet PCR Cloning Kit. Sequencing was performed at Genome Quebec Innovation Centre (Montreal).

2.6. Phylogenetic analysis and primer design

Sequences were analysed with the Vector NTI software (Invitrogen). Sequences similarity and verification of contaminant sequences were performed using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sequence similarity search tool provided by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequence alignment was performed with the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA4) software (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura *et al.*, 2007) and was refined manually.

Sequence polymorphism was analysed separately between clones within each AMF species. The number of positive clones analysed for each species is listed in Table 2.1. Patterns of intra-specific variation were determined following the number of insertion-deletion (indels) and the number of substitutions (transition-transversion) found in the nucleotide sequences.

Twenty-one glomeromycotan β -tubulin sequences were used in our phylogenetic analysis. Thirteen sequences were recovered from public databases and eight new sequences were provided in the present study. Three chytridiomycotan sequences were also used as

outgroup. Accession numbers of taxa used in this phylogenetic analysis are provided in the Table 2.2.

A Neighbor-Joining tree was derived using MEGA4 software (Tamura *et al.*, 2007) for nucleotide sequence data based on nucleotide substitution only (transition-transversion), ignoring positions with gaps and including the third codon position. Phylogenetic tree topology was assessed by 1000 bootstrap replicates. Specific primers were designed based on sequences alignment (Fig. 2.9). The specificity of primers was first tested virtually using the *Amplify X* software (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>) to avoid primer-dimers and hair-pin structures. The specificity of each newly designed pair of primers was tested by PCR performed either on genomic DNA or on DNA from clones. Negative controls were included. The PCR reaction conditions were as described in section 2.3, except that annealing temperatures (T_m) were optimized for each primer set; they are summarized in the Table 2.3.

3. Results

3.1. Intraspecific β -tubulin gene polymorphism

β -tubulin sequences were successfully amplified by PCR from genomic DNA of *G. etunicatum*, *G. aggregatum*, *G. fasciculatum*, *G. cerebriforme* and *G. clarum* using β .Tub.F/ β .Tub.R primers (Fig. 2.2). The size of fragments showing different fluorescent intensities, ranged from 700 to 1000 bp.

Sequence variability was analysed for each AMF species. Three taxa showed an intra-specific polymorphism. Data are summarized in Table 2.1.

Three different β -tubulin clone fragments were obtained for *G. etunicatum* varying from 516 to 893 bp in size. This is the only case where fragments shorter than 800 bp were obtained since difficulties in cloning and sequencing occurred with this species. No intra-specific polymorphism was found in *G. etunicatum*. This may be due to the limited number of clones and to the small length of analyzed sequences (Fig. 2.3).

Six sequences were obtained for *G. cerebriforme*. The size of sequences ranged from 832 to 851 bp. Two paralogs were found and identified as paralog 1 and paralog 2. Paralog 1 was found in two clones (GC11 and GC13), while paralog 2 was found in five clones (GC3,

GC26, GC36 and GC38) as shown in figure 2.4. One sequence representative of each β -tubulin paralog was selected and aligned with the cDNA. Alignment shows the presence of two introns. Paralog 2 differs from paralog 1 by 23 substitutions that represent 2.7% of the sequence length. Transitions account for 91.3% of these substitutions while 8.69% are transversions. The first exon (112 bp) included 56.52% of these substitutions and 43.47% were located in the first intron (69 bp). No indels were detected in the sequences of *G. cerebriforme* (Table 2.1).

Despite the low number of *G. cerebriforme* sequences analysed, our results clearly demonstrate β -tubulin gene polymorphism within this AMF species. However, the magnitude of the genetic polymorphism may exceed our findings.

Seventeen sequences were recovered for *G. aggregatum*, ranging from 845 to 904 bp. As in *G. cerebriforme*, two paralogs were found. Paralog 1 occurred in 5 clones while paralog 2 was found in 12 clones (Fig. 2.5).

The paralogs are very divergent. Indeed, 155 substitutions were found in this specie which represents 19.90% of the nucleotides. Transition accounted for 80.64% of these substitutions and transversions for 14.83% (Table 2.1).

The two paralogs of *G. aggregatum* aligned with the cDNA showed the presence of two introns. Most substitutions (33.54%) are located in the first intron (219 bp) but a smaller percentage of substitutions (9.03%) are rather found in the second intron. The percentage of substitutions (26.45%) found in the first exon (326 bp) are higher than that found in the second exon (23.87%).

The total percentage of substitutions located in the exons (50.32%) was slightly higher than in the introns (42.57%). Eighty-nine indels were also observed, which represented 9.84% of the total length. Most (67.41%) of these indels are located in the first intron and 25.84% in the second intron. Only 6.74% of indels were found in the first exon. However, no indels were found in the second and third exons. The percentage of indels is high in comparison with others relatives.

Thirty sequences were obtained for *G. fasciculatum*. The average length of these sequences ranged from 828 to 918 bp. *G. fasciculatum* also harbored two paralogs. Paralog 1 was found in 25 clones and paralog 2 was found in 5 clones (Fig. 2.6). We observed 155 substitutions which represent 17.01% of the variability. Most (81.94%) of these

substitutions are transition and 18.06% substitutions are transversions (Table 2.1). The alignment of *G. fasciculatum* sequences with cDNA of related AMF species retrieved from GenBank showed the presence of two introns.

The first intron (236 bp) contained 34.83% of the substitutions, 25.16% being in the first exon (324 bp), 25.80% in the second exon (249 bp), and 10.96% in the second intron (71 bp). In addition, 95 indels were found, representing 10.47% of the sequence length. Most indels 73.68% were found to be located in the first intron and 12.63% in the second intron. Nevertheless, the percentage of indels in the coding regions was lower than in the introns (2.10% in the first exon, 3.15% in the second exon, and 8.42% in the third).

Thirty-four sequences were obtained for *G. clarum*, ranging from 860 to 945 bp in length. This was the highest sample size in our study. Alignment of these sequences with the cDNA of related AMF sequences retrieved from GenBank showed the presence of two introns. No genetic polymorphism was recorded among these clones despite the large sample size (Fig. 2.7).

Finally, two highly variable paralogs of the β -tubulin gene were identified in *G. cerebriforme*, *G. aggregatum* and *G. fasciculatum*. In contrast *G. clarum* and *G. etunicatum* have only one gene variant without any notable polymorphism (Table 2.1). All our sequences showed the presence of two non-coding regions (introns) which are very divergent. Observation of the patterns of nucleotide substitutions occurring in the coding regions between AMF species showed that the majority of substitutions were located in the exons and that they are mostly synonymous (90%) and therefore showed a high level of conserved amino acids. Exon sequences could be aligned unambiguously because of the low number of insertions or deletions. Only six indels were found in exon regions of *G. aggregatum*, fifteen indels in *G. fasciculatum* and nine indels in *G. cerebriforme*.

Base composition analysis of β -tubulin nucleotide sequences within each species showed that this gene has a high level of AT content ranging from 63.1% to 62.4% (Table 2.1). In this study, β -tubulin sequences showed a high similarity (98 to 99%) with Glomeromycotan β -tubulin sequences available in the GenBank database. Comparison of the β -tubulin sequences with those of other phyla showed a lower similarity. We found 75% of similarity with Oomycota, 82% with Basidiomycota, 84% with Chytridiomycota, and 79% with Ascomycota.

	T	T	T	A	T	G	T	T	C	A	C	C	A	C	A	T	A	T	C	A	G	A	A	T	A	T	G	A	A	T	A	T	T	A	T	C	A	T	C	A	T	C	A	T	T	T	A	G	C	T
Gen10
Gen7
Gen15

Fig. 2.3: *G. etunicatum* sequences alignment showing: no evidence of polymorphism.

ces alignment showing the presence of two paralogs.

	C	G	G	C	G	G	T	A	C	T	G	G	T	A	T	G	G	G	T	A	C	C	G	G	T	A	T	G	G	G	T	A	C	C	G	G	A	A	T	A	T	C	C	G	G	A	C	C	G		
✓AG611
✓agg12
✓agg24
✓agg38
✓agg39
✓agg19	T	.	T	.	A
✓agg44	T	.	T	.	A
✓agg17	T	.	T	.	A
✓agg16	T	.	T	.	A
✓agg22	T	.	T	.	A
✓agg28	T	.	T	.	A
✓agg37	T	.	T	.	A
✓agg42	T	.	T	.	A
✓agg46	T	.	T	.	A
✓agg5	T	.	T	.	A
✓agg0	T	.	T	.	A
✓agg8	T	.	T	.	A

Fig. 2.5: *G. aggregatum* sequences alignment showing the presence of two paralogs.

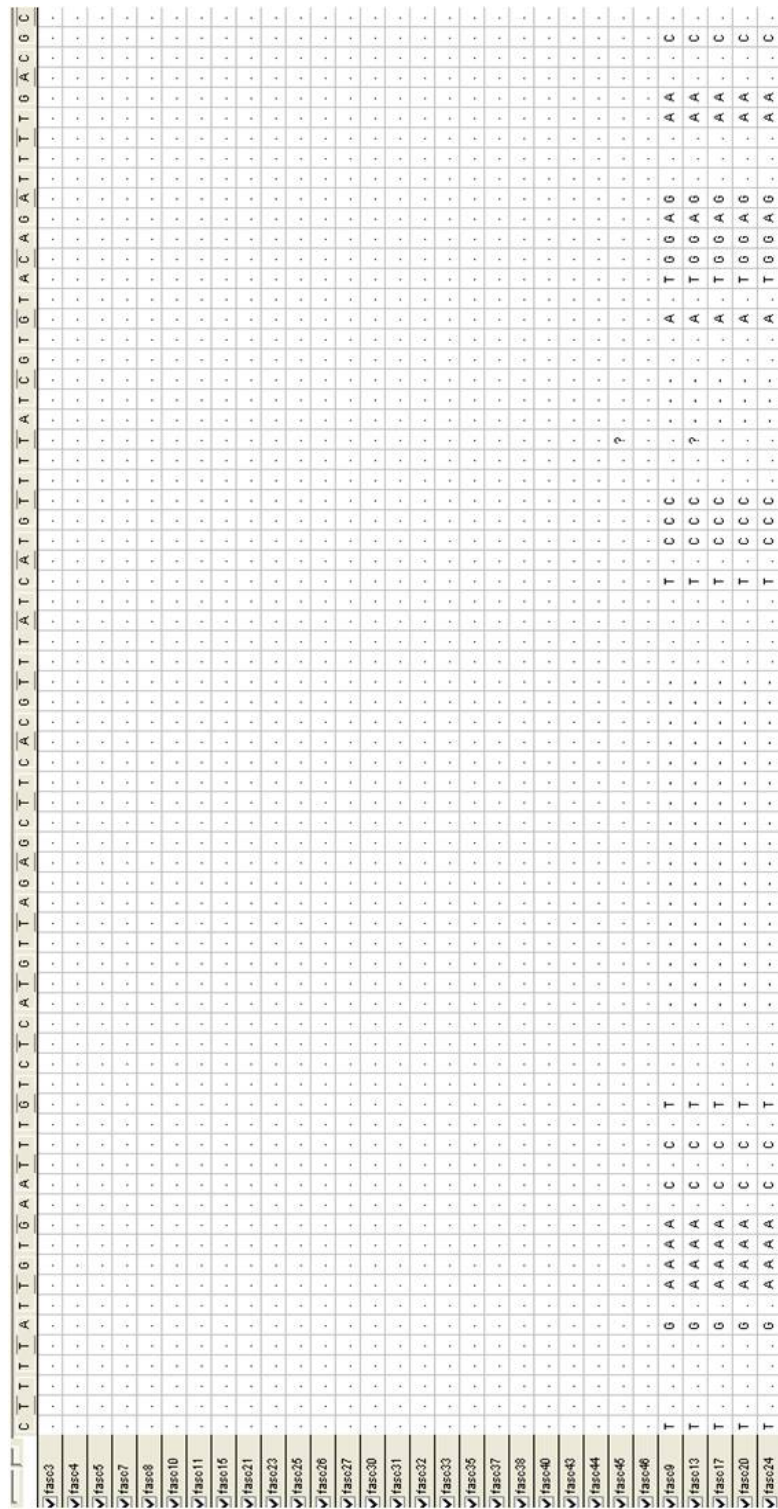


Fig. 2.6: *G. fasciculatum* sequences alignment showing the presence of two paralogs.

[illegible]

Fig. 2.7: *G. clarum* sequences alignment showing no evidence of polymorphism.

Table 2.1. Intraspecific polymorphism analysis for β -tubulin gene within five AMF species.

	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. cerebriforme</i>	<i>G. aggregatum</i>	<i>G. fasciculatum</i>	<i>G. clarum</i>
Clone number	3	6	17	30	34
Sequence length (bp)	513-893	832-851	845-904	828- 918	860-945
AT (%)	62.8	62.6	62.6	62.4	63.1
GC (%)	37.2	37.4	37.4	37.6	36.9
Gene variant	1	2	2	2	1
Substitution number	0	23	155	155	0
Substitution (%)	0	2.7	19.90	17.01	0
Transition (%)	0	91.3	80.64	81.94	0
Transversion (%)	0	8.69	14.83	18.06	0
Indel number	0	0	89	95	0
Indel proportion (%)	0	0	9.84	10.47	0

3.2. Phylogenetic analysis

A phylogenetic analysis was conducted in order to support the development of molecular markers. The two highly variable β -tubulin paralogs newly identified in this study in *G. cerebriforme*, *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* showed high similarities with the two β -tubulin variants previously obtained from *G. intraradices* which have been shown to be monophyletic within *G. intraradices* (Corradi *et al.*, 2004b). Other β -tubulin sequences previously obtained from *G. claroideum*, *G. diaphanum*, *G. proliferum*, *G. geosporum* and *G. constrictum* (Corradi *et al.*, 2004a) were also included in the present analysis (Table 2.2).

All β -tubulin sequences used here showed the presence of two introns highly divergent between paralogs and among taxa which, makes sequence alignment difficult.

The phylogeny based on the β -tubulin gene showed the presence of three major sequence groups: Glomaceae, Acaulosporaceae and Gigasporaceae. Chytridiomycota sequences were used as outgroup in this analysis (Fig. 2.8).

Sequences of Gigasporaceae and group of Acaulosporaceae sequences both are sister to other Glomeraceae with relatively high bootstrap support of 71%. The Glomaceae is divided to four subgroups named Tub.1, Tub.2, Tub.cerb and Tub.geoc (Fig. 2.8). All sequences of the Glomaceae cluster together in a monophyletic clade. The monophyly of Glomaceae sequences is supported by a bootstrap value of 82% (Fig. 2.8).

The paralog sequences (Tub.1, Tub.2 and Tub.cerb) formed a monophyletic group with the Tub.geoc group as sister group, but bootstrap support of the main node is low (54%). The sequences of *G. geosporum* and *G. constrictum* did not show homology either of the paralogs sequences and clustered together in a highly supported (100%) monophyletic group (Tub.geoc). Divergence of *G. geosporum* and *G. constrictum* obviously occurred before the duplication of paralog sequences.

The newly identified paralogs from *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* were not found to be monophyletic within each species. Indeed, the paralogs 1 sequence of *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* clustered in a monophyletic group named Tub.1 which is supported by a relatively high bootstrap of 90%. The paralogs 2 of *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* also grouped in a highly supported (99%) monophyletic group named Tub.2. The paralogs

from *G. cerebriforme* grouped together in the group named Tub.cerb with a bootstrap support of 100% (Fig. 2.8). The unique β -tubulin variants newly obtained from *G. clarum* and *G. etunicatum* grouped in the Tub.1 group (Fig. 2.8).

Table 2.2: List of β -tubulin gene sequences used for the phylogenetic analysis and primer design. Sequences with accession number were retrieved from public databases. Sequences with clone numbers were newly identified by cloning β -tubulin gene.

	Species	Accession number	Sequences length (bp)
1	<i>G. proliferum</i> 1	AJ717322	1055
2	<i>G. proliferum</i> 2	AJ717321	1014
3	<i>G. diaphanum</i> 1	AJ717318	1072
4	<i>G. diaphanum</i> 2	AJ717317	1039
5	<i>G. claroideum</i> 1	AJ717320	1091
6	<i>G. claroideum</i> 2	AJ717319	1010
7	<i>G. geosporum</i>	AJ717323	844
8	<i>G. intraradices</i> 1	AY326320	1078
9	<i>G. intraradices</i> 2	AY326321	1099
10	<i>G. constrictum</i>	AJ717324	841
11	<i>Gigaspora margarita</i>	AJ717325	862
12	<i>Scutellospora castanea</i>	AJ717326	864
13	<i>Acaulospora laevis</i>	AJ717327	858
14	<i>G. cerebriforme</i> 1	Clone n°11	846
15	<i>G. cerebriforme</i> 2	Clone n°3	847
16	<i>G. aggregatum</i> 1	Clone n°5	924
17	<i>G. aggregatum</i> 2	Clone n° 24	867
18	<i>G. fasciculatum</i> 1	Clone n°8	938
19	<i>G. fasciculatum</i> 2	Clone n°17	831
20	<i>G. clarum</i>	Clone n°4	910
21	<i>G. etunicatum</i>	Clone n°15/10	893
22	<i>Rhizophydium</i> sp.	AY138801	1245
23	<i>Blastocladiella britanica</i>	AY131271	1322
24	<i>Powellomyces variabilis</i>	AY138796	1416

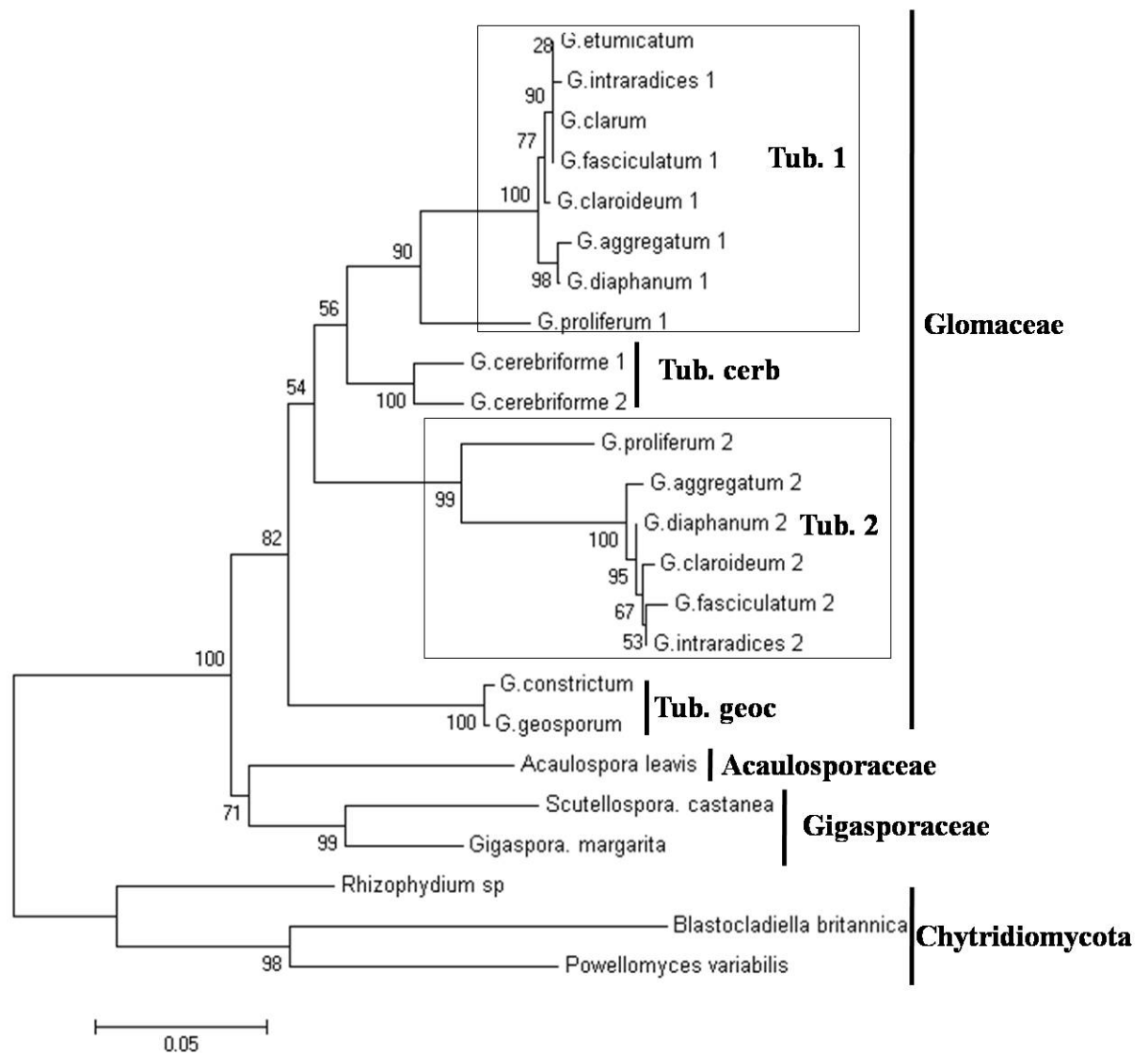


Fig. 2.8: Neighbor-joining tree generated using all codon positions of the β -tubulin nucleotide sequences. Chytridiomycota sequences were used as out-group. Paralogs were numbered according to their clustering in the phylogeny. Numbers at nodes correspond to bootstrap support from a neighbor-joining analysis (1000 replicates). Scale bar represents 0.05 substitutions per site.

3.3. Molecular markers and specificity tests

The entire dataset, including the sequences newly obtained here and those retrieved from databases, was used to design specific primers in order to identify AMF taxa. However, primers were only designed for the taxa for which we had DNA samples. The locations of the specific primers on β -tubulin sequences are shown in figure 2.9. The first PCR amplification test was performed on DNA from the Tub.1 group. Amplification of β -tubulin fragments was achieved by using the newly designed primer pair: β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R (Table 2.3). The DNA from the clone of *G. cerebriforme* was used as a negative control because it does not belong to the Tub.1 group. The *G. claroideum* and *G. proliferum* were unfortunately not included in this test because their genomic DNA is lacking.

PCR patterns showed that all species belonging to group Tub.1 (except *G. etunicatum*) gave one band on the agarose gel with the expected size of 540 bp (Fig. 2.10; lanes 2, 4, 5, 6 and 7). The negative control *G. cerebriforme* gave a lower band with a size of 450 bp (Fig. 2.10; lane1). This band was compared to the other bands of the Tub.1 group and showed that the β -tubulin fragment amplified from *G. cerebriforme* exhibits a high divergence in length from those of Tub.1 group. The β -tubulin fragment amplification for Tub.1 group was successfully achieved by using the β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R primer pair and all fragments showed one band with a 540 bp length except for *G. etunicatum* which did not show any PCR band. This lack of result is probably being due to the quality of DNA from clone GE15 or annealing problem.

A second primer pair β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R (Table 2.3) was designed according to sequences alignment for group Tub.1 (Fig. 2.9). The PCR amplification test was carried out on DNA of the Tub.1 group. Genomic DNA of *G. intraradices* 197198, *G. intraradices* geo-rac and *G. diaphanum* and DNA from clones of *G. clarum*, *G. aggregatum* 1, *G. fasciculatum* 1 and *G. etunicatum* were used in this reaction. DNA samples from clones of *G. aggregatum* 2, *G. fasciculatum* 2, *G. cerebriforme* 1 and *G. cerebriforme* 2 were used as negative controls. The DNA of clone GE10 was used instead that of clone GE15 and the T_m were optimized (Table 2.3). PCR patterns showed that the *G. intraradices* 197198, *G. intraradices* geo-rac and *G. diaphanum* do not produce any band (Fig.2.11; lane 5, 6 and

8). Contrarily, *G. aggregatum* 1, *G. fasciculatum* 1, *G. etunicatum* and *G. clarum* showed one band on the agarose gel with the expected size of 380 bp (Fig. 2.11; lane 7, 9, 10 and 11).

β -Tub.cerb.F/ β -Tub.cerb.R (Table 2.3) were designed to specifically amplify both *G. cerebriforme* paralogs forming the group named Tub.cerb. A specific band for *G. cerebriforme* was obtained with the expected size of 401 bp (Fig. 2.12; lane 4).

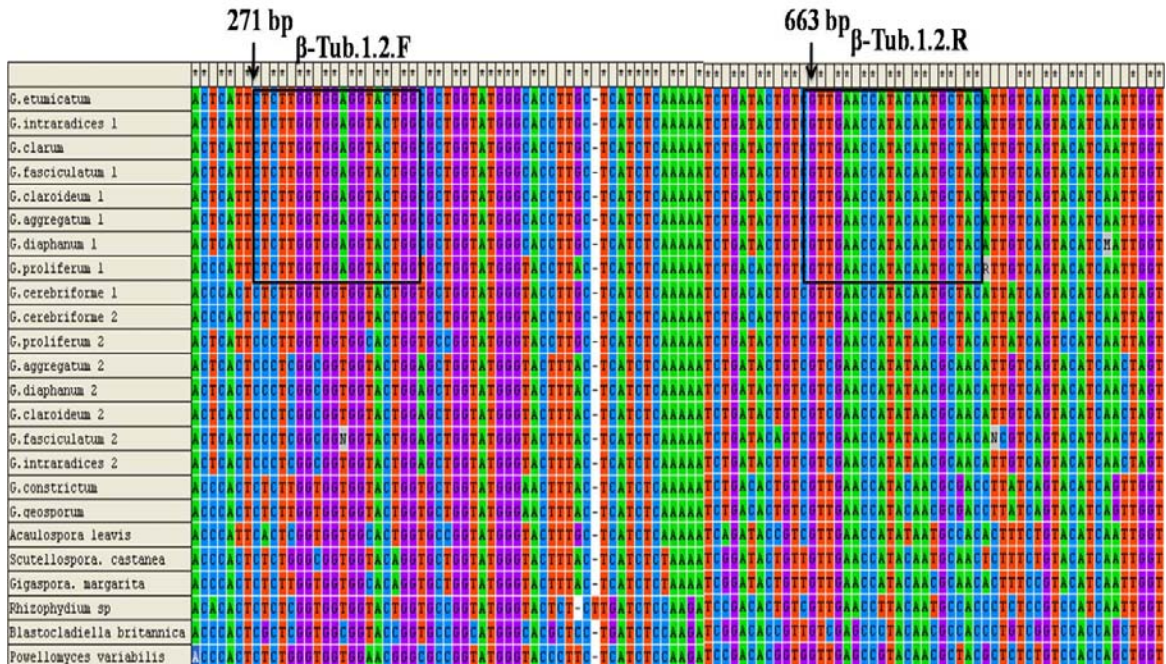
The negative controls *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* gave one band with a size of 500 bp (Fig. 2.12; lane 2 and 3) while no clear band but rather a smear was observed with *G. etunicatum* (Fig. 2.12; lane 1).

One primer set named β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R was designed for β -tubulin paralogs sequences of group Tub.2 (Fig. 2.9). PCR patterns showed that the species *G. intraradices* geo-rac, *G. intraradices* 197198 and *G. diaphanum* (Fig. 2.13, lane 7, 8 and 9), belonging to the group Tub.2, did not show any band on the agarose gel. The PCR pattern of the *G. aggregatum* 2 showed the presence of two bands on the agarose gel. The first band size was 1000 bp and the second band was with the expected size of 375 bp (Fig. 2.13, lane 11). Only one band, with the expected size of 375 bp, was recovered for the PCR test with the positive control *G. fasciculatum* 2 (Fig. 2.13, lane 10).

All negative controls showed the presence of one band with a 375 bp length. These bands should not be present on the gel if the primer β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R was specific.

Table 2.3: Primer pairs designed for some AMF species from variable and conserved regions of β -tubulin sequences.

β-tubulin sequences groups	Primers (5'-3')	Primer position (bp)	T_m (°C)	Fragment length (bp)	Negative controls
Tub.1 group	β-Tub.1.F TATGGGCACCTTGCTCATCT β-Tub.1.R TCAATTGACCAGGGAATCGT	372 892	60	540	<i>Glomus cerebriforme</i>
Tub.1 group	β-Tub.1.2.F CTCTTGGTGGAGGTACTGGC β-Tub.1.2.R GCATTGTATGGTTCAACGAC	271 663	70	380	<i>Glomus fasciculatum</i> 2 <i>Glomus aggregatum</i> 2 <i>Glomus cerebriforme</i> 1, 2
Tub.cerb group	β-Tub.cerb.F GTGGTGGTACTGGTGCTGG β-Tub.cerb.R CACCATAAGTTGGGGTGCTC	229 610	58	401	<i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus aggregatum</i> 1 <i>Glomus fasciculatum</i> 1
Tub.2 group	β-Tub.2.F CTCCCTCGGCGGTGGTACTGGAGC β-Tub.2.R CGCCATAAGTTGGAGTATTTAG	269 778	82	375	<i>Glomus fasciculatum</i> 1 <i>Glomus aggregatum</i> 1 <i>Glomus clarum</i> <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus cerebriforme</i> 1, 2



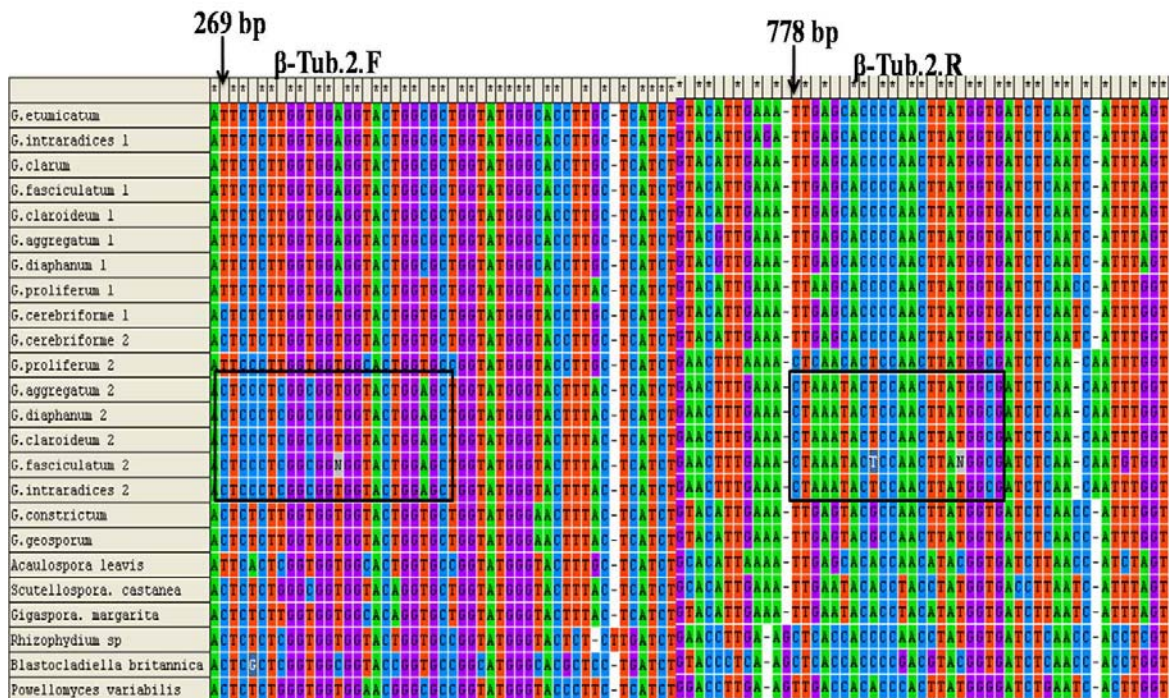
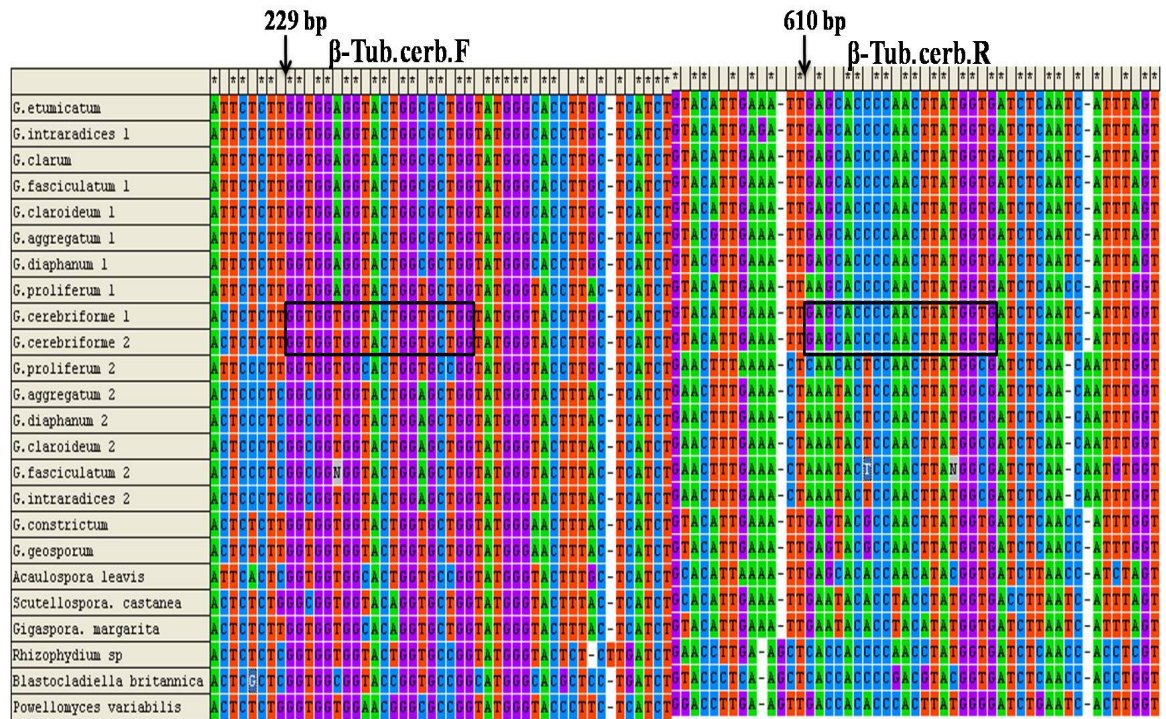


Fig. 2.9: Primer pair positions on AMF β -tubulin sequences alignment. The name of primers is indicated at the top of sequences alignment.

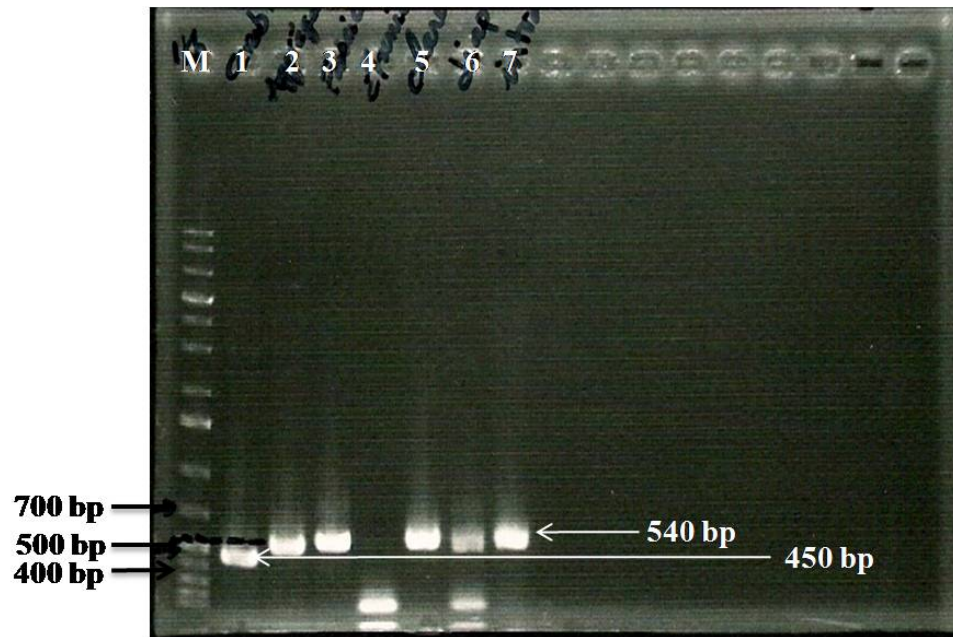


Fig. 2.10: Agarose gel electrophoresis of β -tubulin fragments, from the group Tub.1, amplified by PCR using primers: β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R. Negative control: lane 1, *G. cerebriforme*. Positive controls: lane 2, *G. aggregatum*; lane 3, *G. fasciculatum*; lane 4, *G. etunicatum*; lane 5, *G. clarum*; lane 6, *G. diaphanum* and lane 7, *G. intraradices*. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder).

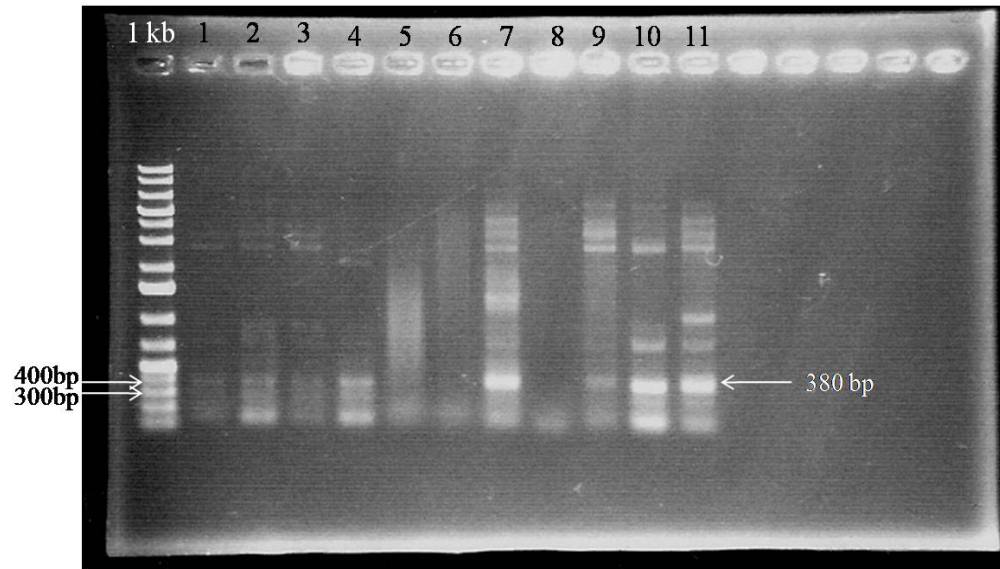


Fig. 2.11: Agarose gel electrophoresis of β -tubulin fragments, from the group Tub.1, amplified by PCR using primers: β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R. Lane 1-4, negative controls; Lane 1, *G. fasciculatum* 2; lane 2, *G. aggregatum* 2; lane 3, *G. cerebriforme* 1 and lane 4, *G. cerebriforme* 2. Lane 5-11, positive controls; Lane 5, *G. intraradices* geo-rac; lane 6, *G. intraradices* 197198; lane 7, *G. aggregatum* 1; lane 8, *G. diaphanum* 1; lane 9, *G. fasciculatum* 1; lane 10, *G. etunicatum* and lane 11, *G. clarum*. Lane 1kb, molecular size marker.

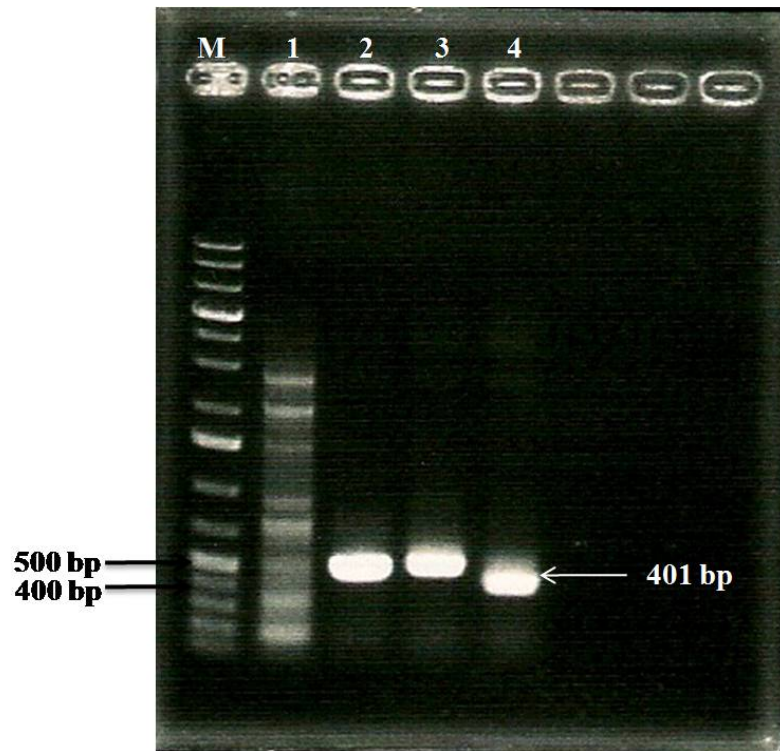


Fig. 2.12: Agarose gel electrophoresis of *G. cerebriforme* β -tubulin fragment by PCR using pair primers: β -Tub.cerb.F/ β -Tub.cerb.R. Lane 1-3, negative controls; lane 1, *G. etunicatum*; lane 2, *G. aggregatum* 1 and lane 3, *G. fasciculatum* 1. Lane 4, *G. cerebriforme* with the expected size of 401 bp. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder).



Fig. 2.13: Agarose gel electrophoresis of β -tubulin fragment amplified by PCR using pair primers: β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R. Lane 1-6, negative controls; lane 1, *G. fasciculatum* 1; lane 2, *G. aggregatum* 1; lane 3, *G. clarum*; lane 4, *G. etunicatum*; lane 5, *G. cerebriforme* 1 and lane 6, *G. cerebriforme* 2. Lane 7-11, positive controls; lane 7, *G. intraradices* geo-rac; lane 8, *G. intraradices* 197-198; lane 9, *G. diaphanum*; lane 10, *G. fasciculatum* 2 and lane 11, *G. aggregatum* 2. Lane M, molecular size marker (1-Kb ladder).

4. Discussion

Studies of beta-tubulin gene in AMF are scarce. Corradi et al. (2004) have used beta-tubulin to identify paralogs in four species of the *Glomus* genus, out of nine species covering three families in Glomeromycota. Msiska and Morton (2009) have analyzed the largest sample of AMF taxa including 45 species covering all Glomeromycota families except Pacisporaceae and Geosiphonaceae. Their studies have addressed phylogenetic relationships among AMF taxa at different taxonomic levels and have shown some discrepancy between β -tubulin gene and 18S rRNA gene phylogenies.

Our study revealed two highly variable β -tubulin paralogs within *G. aggregatum*, *G. cerebriforme* and *G. fasciculatum* in addition to those previously reported *G. intraradices*, *G. claroideum*, *G. diaphanum* and *G. proliferum* (Corradi et al., 2004b). The high divergence observed between paralogs was due to nucleotide substitution (transition, transversion) and indels (Table 2.1). These paralogs showed high similarities for the seven species of *Glomus* genus. Out of 12 species of *Glomus* analyzed so far, 7 contained two divergent paralogs. In addition, these taxa showed an important intra-isolate genetic polymorphism. However, we did not detect any polymorphism or evidence for the presence of paralogs in the AMF *G. clarum* even though we sequenced a large number of clones (34 clones). *G. etunicatum* did not show any evidence for polymorphism. Yet, the number of clones analyzed (3 clones) was limited because of some problems in sequencing, which may bias our conclusion. No evidence for the presence of paralogs has been found in *G. constrictum* (BEG19), *G. geosporum*, *Acaulospora laevis* and *Gigaspora margarita* (Corradi et al., 2004a) and in two species in Scutellosporaceae, *Scutellospora heterogama* (Msiska & Morton, 2009) and *Scutellospora castanea* (Corradi et al., 2004a). Msiska & Morton (2009) have analyzed 30 clones of 3 isolates for polymorphism in *S. heterogama*. They found a high variation in sequences and this variation occurred in coding regions and affected some amino-acid changes.

Analysis of the base composition of β -tubulin nucleotide sequences indicates that the β -tubulin genes of AMF have a relatively low GC content, in contrast to other fungal phyla. This is typical for AMF that have AT-rich genomes (Hosny et al., 1997; Corradi et al., 2004b). The alignment of the β -tubulin sequences with cDNA showed the presence of three

exons regions and two introns of variable lengths, located in the same position in all AMF species. The number of introns found in our sequences was consistent with that number reported by Corradi et al. (2004a), but differed with the result reported by Msiska & Morton (2009). This may be due to the size of the β -tubulin gene fragments amplified (516-945 bp) and the primers used. Molecular divergence between the introns at homologous positions in the AMF was very high and therefore their alignment was not possible. These regions could therefore provide efficient markers to identify AMF species.

A high number of substitutions was encountered between exonic regions of β -tubulin paralogs and the majority of these were synonymous (90%). These paralog sequences were found to have a high level of conserved amino-acids. This result could be explained by the negative selection pressure acting on AMF β -tubulin genes. Our results were similar to the β -tubulin intraspecific polymorphism analyses of Corradi et al. (2004a, b) for *G. intraradices*, *G. claroideum*, *G. diaphanum* and *G. proliferum*. However, the 10% non-synonymous substitutions were found in the coding regions and that resulted in some amino-acids changes indicating that some variations are not selectively neutral and that the β -tubulin gene may exist as different functional variants within each AMF species. This hypothesis might be supported by the different functional variants of the β -tubulin gene found in different isolates of AMF species (Msiska & Morton, 2009). The high conservation of amino-acids level and intron position in β -tubulin gene allow us to consider that these species represent an ancient fungal group (400 million years) (Remy *et al.*, 1994), that has not evolved or has evolved at a slow evolutionary rate compared with other fungal phyla because of strong purifying selection.

The newly identified paralogs from *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* were not found to be monophyletic within each species but rather to segregate in the phylogenetic tree in relation with a duplicative event. Indeed, the two paralogs sequences of *G. aggregatum* and *G. fasciculatum* clustered together in different monophyletic groups, named here Tub.1 and Tub.2. This is concordant with those of Corradi et al. (2004a, b) who found that paralogs of *G. intraradices*, *G. claroideum*, *G. diaphanum* and *G. proliferum* were not monophyletic within each species. Contrarily, the paralog sequences newly identified from *G. cerebriforme* were found to be monophyletic and were grouped in the monophyletic group Tub.Cerb with a 100% bootstrap support.

According to the sequences that we have been obtained and analyzed, the segregation of the paralog sequences occurred after the divergence of Acaulosporaceae and Gigasporaceae, even after the divergence of some *Glomus* species such as *G. geosporum* and *G. constrictum*. This result is consistent with the phylogenetic analysis of Corradi et al. (2004a). The duplication of the *G. cerebriforme* paralogs would have occurred after the duplication of the paralogs of Tub.1 group and those of Tub.2 group, but the support for the duplication event is relatively low (54%). This leaves a doubt about the position of the duplication event in the AMF phylogeny. Due to paralog sequences in *Glomus* and in other genera, the β -tubulin gene can produce trees with poor resolution and poor support at the order level (Msiska & Morton, 2009). More work is needed to determine the number of β -tubulin paralog copies in species of other groups.

Several approaches based on rRNA gene sequences data (Simon et al., 1992; Simon et al., 1993b; Helgason et al., 1998; Helgason et al., 1999; Kjoller & Rosendahl, 2000) were used to develop molecular markers that would allow species identification of AMF fungi independent from spore formation. However, all these studies report problems with sequence markers from the rRNA genes of the Glomeromycota. The rRNA genes sequences show variations within spores and morphospecies and there is no perfect correlation between sequence identity and species identity (Sanders et al., 1995). AMF specific primers were designed to amplify β -tubulin gene through a nested PCR approach, but these primers did not allow unambiguous AMF identification at the species and genus level (Corradi et al., 2004a; Msiska & Morton, 2009).

By considering the molecular variation found between and within AMF species, we rather designed molecular markers for *Glomus* β -tubulin sequence groups. Two primer sets (β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R and β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R) were designed for β -tubulin sequences of group Tub.1; one primer set (β -Tub.cerb.F/ β -Tub.cerb.R) was designed for *G. cerebriforme* paralogs and one primer set (β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R) for group Tub.2. All bands we recovered in the PCR specificity test using the β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R primers were found to be specific for each sequence of Tub.1 group. Amplified β -tubulin fragments showed one band with a 540 bp length except for *G. etunicatum*, which did not show any band. This is probably due to the low quality of DNA from the clone GE15 or to annealing problems. A second PCR test was carried out using the β -Tub.1.2.F/ β -Tub.1.2.R primers. The absence of

band observed for *G. intraradices* geo-rac, *G. intraradices* 197198 and *G. diaphanum* cannot be due to the quality of genomic DNA, because the same genomic DNA gave bands with the primers β -Tub.1.F/ β -Tub.1.R. It may therefore be due to an annealing problem. The bands recovered for the negative controls were probably due to an hair-pin formation. The presence of band in the negative controls and the presence of smear bands or the complete absence of band for positives controls may be due to the use of an inadequate T_m . The *G. cerebriforme* paralogs could be distinguished from other *Glomus* species, based on the specific band size (401 bp) recovered with the Tub.cerb.F/ β -Tub.cerb.R primer. This primer pair could be useful to identify *G. cerebriforme* from *G. etunicatum*, *G. aggregatum* and *G. fasciculatum*. However, other *Glomus* species should be used as negative controls and PCR conditions should be optimized to assert that this primer set is specific to *G. cerebriforme*.

The primer set β -Tub.2.F/ β -Tub.2.R was not specific for the paralog sequences of group Tub.2. The presence of a clear band in the negative controls is probably due to the fact that the nucleotide sequences of the primers differed by only six nucleotides from the homologues sequences of the negative controls. Thus, increasing of the annealing temperature or the use of quantitative PCR may solve this problem.

The low number of AMF genomic DNA samples unfortunately limited the specificity tests. For example, *G. claroideum*, *G. proliferum*, *G. geosporum*, *G. constrictum*, *Gigaspora margarita*, *Acaulospora laevis* and *Scutellospora castanea* were not included in the design of molecular markers and PCR tests.

In conclusion, the β -tubulin gene has the same power as the 18S and 25S rRNA genes to resolve phylogenetic relationships among AMF at the species level. However, due to paralogous sequences, the β -tubulin gene can produce trees with poor resolution. More work needs to be done to determine the number of β -tubulin gene copies in species of other AMF groups. The use of β -tubulin gene alone could not discriminate closely related species because of their sequence similarities. Therefore, other ANF genes analyses are necessary to complement β -tubulin gene for molecular identification.

Conclusion générale

Bien que la phylogénie basée sur les séquences du gène β -tubuline, soit de plus en plus étudiée, beaucoup d'ambiguités entoure la taxonomie des CMA. Cette ambiguïté est due aux lacunes dans nos connaissances de la variabilité génétique et du nombre de copies du gène β -tubuline chez chaque espèce de CMA. Dans mon projet, j'ai étudié le polymorphisme intra- et inter-spécifique chez cinq espèces de CMA, à savoir *G. aggregatum*, *G. cerebriforme*, *G. clarum*, *G. etunicatum* et *G. fasciculatum*. Plusieurs clones de séquences du gène β -tubuline ont été analysés pour chaque espèce, à l'exception de *G. etunicatum* où seulement trois clones ont été analysés. Deux séquences paralogues du gène β -tubuline ont été identifiées chez *G. aggregatum*, *G. cerebriforme* et *G. fasciculatum*. Aucun polymorphisme n'a été détecté chez *G. clarum* malgré le nombre élevé de clones analysés (34 clones). Un seul variant du gène β -tubuline a été retrouvé chez *G. etunicatum*. Cependant, le nombre limité de clones analysés pour cette espèce (3 clones), due à la qualité du séquençage, ne reflète probablement pas le polymorphisme réel du gène β -tubuline au sein de cette espèce. Toutes les séquences montrent une similarité avec les séquences de Glomeromycota déposées dans la base de données GenBank. En plus des régions codantes, toutes les séquences montrent la présence de deux introns localisés dans la même position chez tous les CMA. Ces introns sont hautement variables et de tailles différentes. Le nombre élevé de variations, dues à la différence de taille et au nombre d'indels, rend difficile l'alignement de ces régions. Un nombre élevé de substitutions a aussi été retrouvé dans les exons. Cependant, 90% de ces substitutions sont synonymes. Ces régions ont été alignées sans ambiguïté étant donné la présence d'un nombre très réduit d'indels. La conservation du nombre et de la position des introns, ainsi que la conservation de séquences d'acides aminés dans le gène β -tubuline, supporte que les CMA forment un groupe de champignons très primitif (400 millions d'années) (Remy *et al.*, 1994), qui a très peu évolué comparativement aux autres phylum, à cause de l'action de la sélection négative sur ce gène. L'analyse des séquences nucléotidiques du gène β -tubuline montre la présence d'un faible pourcentage de bases GC (36.9 à 37.7%) et un pourcentage élevé de bases AT (62.4 à 63.1%). Une analyse phylogénétique a été menée en vue de soutenir le développement de marqueurs moléculaires. Les séquences des Glomaceae sont groupées dans un clade monophylétique avec les Acaulosporaceae et Gigasporaceae comme groupes

frères. L'analyse phylogénétique montre que les séquences paralogues nouvellement identifiées sont polyphylétiques. En effet, les deux paralogues de chaque espèce ont formé deux groupes séparés. La ségrégation des séquences paralogues semble être due à une duplication qui a eu lieu après la divergence des Acaulosporaceae et Gigasporaceae et même après la divergence de certaines espèces de *Glomus* (*G. geosporum* et *G. constrictum*).

Les marqueurs moléculaires ont été développés pour deux groupes de séquences du genre *Glomus*. L'amplification des fragments du gène β -tubuline à l'aide de ces amorces a permis d'obtenir des bandes spécifiques pour les séquences paralogues de *G. cerebriforme* et pour les séquences du groupe Tub.1. La taille de ces fragments peut constituer un outil potentiel d'identification de certaines espèces (*G. cerebriforme*) ou de certains groupes d'espèces de CMA (groupe Tub.1).

Le gène β -tubuline permet l'analyse phylogénétique des espèces de CMA. Toutefois, la présence de séquences paralogues chez certains CMA, réduit la résolution des arbres phylogénétiques. Le gène β -tubuline ne permet pas le développement de marqueurs moléculaires spécifiques pour l'identification des espèces de CMA. Notre étude suggère que l'analyse de séquence d'autre gène de CMA tel que les gènes mitochondriaux combinée à celle du gène β -tubuline pourrait permettre le développement de marqueurs moléculaires spécifiques pour les CMA.

Bibliographie générale

- Aldwell REB, Hall IR. 1987.** A review of serological technique for the identification of mycorrhizal fungi. In: Sylvia, D M. Hung, LL. Graham, J.H. Mycorrhiza in the next decade. University of Florida, Gainesville, USA 305-307.
- Ames RN, Schneider RW. 1979.** *Entrophospora*, a new genus in the Endogonaceae. *Mycotaxon* **8**: 347-352.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**: 1496-1507.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**: 949-958.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2002.** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128**: 108-124.
- Beauregard MS, Hamel C, St-Arnaud M. 2008.** AM fungi communities in major intensive north american grain productions. In: Siddiqui, Z.A. Akhtar, S. Futai, K. (eds). *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Springer, the Netherlands. 135-158.
- Bécard G, Fortin JA. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.
- Bécard G, Piché Y. 1992.** Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: Review and proposed methodology. **24**: 89-108.
- Becker WN, Hall IR. 1976.** *Gigaspora margarita*, a new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon*: 155-160.

- Berbee ML, Taylor JW. 2007.** Rhynie chert: A window into a lost world of complex plant-fungus interactions. *New Phytologist* **174**: 475-479.
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL. 1984.** A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* **62**: 2128-2134.
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL. 1985.** A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany* **63**: 184-194.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH. 1995.** Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* **130**: 259-265.
- Corradi N, Hijri M, Fumagalli L, Sanders IR. 2004a.** Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) harbour ancient fungal tubulin genes that resemble those of the chytrids (Chytridiomycota). *Fungal Genetics and Biology* **41**: 1037-1045.
- Corradi N, Kuhn G, Sanders IR. 2004b.** Monophyly of beta-tubulin and H⁺-ATPase gene variants in *Glomus intraradices*: Consequences for molecular evolutionary studies of am fungal genes. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 262-273.
- Cox G, Sanders F. 1974.** Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* **73**: 901-912.
- Da Silva GA, Lumini E, Maia LC, Bonfante P, Bianciotto V. 2006.** Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* **16**: 183-189.
- Dalpé Y. 1994.** *Gigaspora margarita*. Fungi Canadenses No. 331. *Canadian Journal of Plant Pathology* **16**: 229-230.

- Dalpe Y. 1995.** Systématique des endomycorhizes à arbuscules : De la mycopaléontologie à la biochimie. In: Fortin, J. A. Charest, C. Piché, Y. (eds). La symbiose mycorhizienne. États des connaissances. Orbis publishing. 1-17.
- Dalpe Y, Koske RE, Tews LL. 1992.** *Glomus-lamellosum* new-species a new Glomaceae associated with beach grass. *Mycotaxon* **43**: 289-293.
- Di Bonito R, Elliott ML, Des Jardin EA. 1995.** Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 2809-2810.
- Diederichs C. 1991.** Influence of different P sources on the efficiency of several tropical endomycorrhizal fungi in promoting the growth of *Zea mays* l. *Fertilizer Research* **30**: 39-46.
- Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2000.** Modulation of host defence systems. In: Kapulnik, Y. & Douds JR, D. D. (eds). Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function. Kluwer academic publishers 173-200.
- Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpe Y, St-Arnaud M, Coughlan AP, Piché Y. 2002.** Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique* **80**: 1-20.
- Fortin JA, Plenchette C, Piché Y. 2008.** Les mycorhizes: La nouvelle révolution verte. Editions multimondes. Canada.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1974.** The Endogonaceae in the pacific northwest. *Mycologia Memoir* **5**: 27.
- Giovannetti M, Gianinazzi-Pearson V. 1994.** Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **98**: 705-715.

- Harrison MJ. 1999.** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 361-389.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 1998.** Ploughing up the wood-wide web? (low diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in arable sites). *Nature* **394**: 431.
- Helgason T, Fitter AH, Young JPW. 1999.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology* **8**: 659-666.
- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH. 2002.** Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* **90**: 371-384.
- Helgason T, Watson IJ, Young JPW. 2003.** Phylogeny of the Glomerales and diversisporales (fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters* **229**: 127-132.
- Hijri M, Hosny M, van Tuinen D, Dulieu H. 1999.** Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fungal Genetics and Biology* **26**: 141-151.
- Hijri M, Sanders IR. 2005.** Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* **433**: 160-163.
- Ho I. 1977.** Phytosterols in root systems of mycorrhizal and nonmycorrhizal *zea mays* L. *Journal of the New York Entomological Society* **40**: 476-478.
- Hosny M, Hijri M, Passerieux E, Dulieu H. 1999.** rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene* **226**: 61-71.

- Hosny M, Païs de Barros J-P, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1997.** Base composition of DNA from glomalean fungi: High amounts of methylated cytosine. *Fungal Genetics and Biology* **22**: 103-111.
- Jakobsen I. 1995.** Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. In: *Mycorrhiza: Structure, fonction, molecular biology and biotechnology*. Springer 305-332.
- Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **168**: 687-696.
- Juge C. 2008.** Étude morphologique de l'architecture fine du mycélium de champignons mycorrhiziens arbusculaires du genre *Glomus*. Université Laval, Québec.
- Juge C. 2009.** Growth and branching of asymbiotic, pre-symbiotic and extraradical arbuscular fungal hyphae: Clarification of concepts and terms. In: Khasa. P, Piché. Y, Coughlan. A. P (eds) *advances in mycorrhizal science and technology*. National research council canada, CABI publishing.
- Juge C, Samson J, Bastien C, Vierheilig H, Coughlan A, Piché Y. 2002.** Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: A critical cold-storage period. *Mycorrhiza* **12**: 37-42.
- Kjoller R, Rosendahl S. 2000.** Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism). *Plant and Soil* **226**: 189-196.
- Koch AM, Kuhn G, Fontanillas P, Fumagalli L, Goudet J, Sanders IR. 2004.** High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2369-2374.

- Koide RT, Mosse B. 2004.** A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* **14**: 145-163.
- Koske RE. 1986.** Keys to *Glomus* species with spores lacking characteristics that make them easy to identify (humor). *Mycological Society of America Newsletter* **37**: 59.
- Krishna KR. 2005.** Mycorrhizas : A molecular analysis. Science publisher, Inc.
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. 2001.** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **414**: 745-748.
- Lanfranco L, Bianciotto V, Lumini E, Souza M, Morton JB, Bonfante P. 2001.** A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Gomales). *New Phytologist* **152**: 169-179.
- Lanfranco L, Wyss P, Marzachi C, Bonfante P. 1995.** Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology* **4**: 61-68.
- Lang BF, Hijri M. 2009.** The complete *Glomus intraradices* mitochondrial genome sequence - a milestone in mycorrhizal research. *New Phytologist* **183**: 3-6.
- Lee J, Young JPW. 2009.** The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist* **183**: 200-211.
- Lerat S, Gauci R, Catford JG, Vierheilig H, Piché Y, Lapointe L. 2002.** ¹⁴C transfer between the spring ephemeral *Erythronium americanum* and sugar maple saplings via arbuscular mycorrhizal fungi in natural stands. *Oecologia* **132**: 181-187.
- Maia LC, Kimbrough JW, Benny L. 1993.** Ultrastructural studies of the spore wall of *Gigaspora albida* (Glomales). *Mycologia* **85**: 883-889.

- Martins MA. 1992.** The role of the external mycelial network of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: A study of carbon transfer between plants interconnected by a common mycelium. *Mycorrhiza* **2**: 69-73.
- Merryweather J, Fitter A. 1998.** The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist* **138**: 117-129.
- Morton JB. 1993.** Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza* **2**: 97-109.
- Morton JB, Benny GL. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* **37**: 471-491.
- Morton JB, Redecker D. 2001.** Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* **93**: 181-195.
- Mosse B. 1956.** Fructifications of an *Endogone* sp. Causing endotrophic mycorrhiza in fruit plants. *Ann. Bot.* 349.
- Mosse B. 1959.** The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. Causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society* **42**: 273.
- Msiska Z, Morton JB. 2009.** Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial beta-tubulin gene sequences. *Mycorrhiza* **19**: 247-254.
- Oehl F, Redecker D, Sieverding E. 2005.** *Glomus albidum*, a new sporocarpic mycorrhizal fungal species from european grasslands with higher soil pH. *Journal of Applied Botany* **79**: 38-43.

- Pfeffer PE, Douds JR DD, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon and the metabolism and transport of the lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **120**: 587-598.
- Pirozynski K, Dalpé Y. 1989.** Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* **7**: 1-36.
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393-398.
- Purin S, Rillig MC. 2007.** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalean: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* **51**: 123-130.
- Redecker D. 2000.** Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* **10**: 73-80.
- Redecker D. 2002.** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Research in Microbiology* **153**.
- Redecker D, Hijri I, Wiemken A. 2003.** Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* **38**: 113-124.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000b.** Glomalean fungi from the ordovician. *Science* **289**: 1920-1921.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000a.** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**: 276-284.
- Redecker D, Raab P. 2006.** Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): Recent developments and new gene markers. *Mycologia* **98**: 885-895.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994.** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Plant Biology* **91**: 11841-11843.

- Rodriguez A, Clapp JP, Dodd JC. 2004.** Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Journal of Ecology* **92**: 986-989.
- Rosendahl S. 2008.** Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **178**: 253-266.
- Rosendahl S, Matzen HB. 2008.** Genetic structure of arbuscular mycorrhizal populations in fallow and cultivated soils. *New Phytologist* **179**: 1154-1161.
- Rosendahl S, Sen S, Hepper CM, Azcón-Aguilar C. 1989.** Quantification of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) in the roots of leek (*Allium porrum*) on the basis of the activity of diagnostic enzymes after polyacrilamide gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry* **21**: 519-522.
- Sanders IR. 2004.** Intraspecific genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi and its consequences for molecular biology, ecology, and development of inoculum. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1057-1062.
- Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemken A. 1995.** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: Application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* **130**: 419-427.
- Schüssler A. 2002.** Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 75-83.
- Schüssler A, Gehrig H, Schwarzott D, Walker C. 2001b.** Analysis of partial Glomales SSU RNA gene sequences: Implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* **105**: 5-15.
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C. 2001a.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.

- Sieverding E, Oehl F. 2006.** Revision of *Entrophospora* and description of *kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **80**: 69-81.
- Simon L. 1995.** Systématique moléculaire des champignons endomycorhizogènes. In: Fortin, JA. Charest, C. Piché, Y. (eds). La symbiose mycorhizienne. État des connaissances. Éditions orbis publishing. 21-33.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M. 1993a.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD. 1992.** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied & Environmental Microbiology* **58**: 291-295.
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M. 1993b.** Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Applied & Environmental Microbiology* **59**: 4211-4215.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V, Koide R, Cairney JWG. 1994.** Nutrient transport in mycorrhizas: Structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis *Plant and Soil* **159**: 103-113.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic press.
- Spain J, Sieverding E, Oehl F. 2006.** *Appendicispora*: A new genus in the arbuscular mycorrhiza Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. *Mycotaxon* **97**: 163-182.
- St-Arnaud M, Hamel C, Caron M, Fortin JA. 1994.** Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal tagetes patula colonized with *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **16**: 187-194.

- St-Arnaud M, Hamel C, Caron M, Fortin JA. 1995b.** Endomycorhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: Synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. In: La symbiose mycorrhizienne. État des connaissances. Fortin, J. A. Charest, C et Piché, Y. Éditions orbis publishing. 51-87.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1995a.** Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* **5**: 431-438.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996.** Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**: 328-332.
- St-Arnaud M, Vujanovic V. 2007.** Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: Hamel, C & Plenchette, C. (eds). Mycorrhizae in crop production: Applying knowledge. Haworth press, Binghampton, NY. 67-122.
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint JP, Vierheilig H, Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint J-P, Vierheilig H. 2007.** Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* **12**: 1290-1306.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596–1599.
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H. 1995.** Fossil arbuscular mycorrhizae from the early devonian. *Mycologia* **87**: 560-573.
- Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C. 2004.** Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith

and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. In an *in vitro* compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 251-260.

Trappe JM, Gerdemann JW. 1979. A neotype of *Endogone pisiformis*. *Mycologia* **71**: 206-209.

Van Der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69-72.

Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* **7**: 879-887.

Villegas J, Fortin JA. 2001. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH_4^+ as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany* **79**: 865-870.

Villegas J, Fortin JA. 2002. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO_3^- as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany* **80**: 571-576.

Walker C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: Spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* **18**: 443-455.

Walker C. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: II. A fifth morphological wall type in endogonaceous spores. *Mycotaxon* **25**: 95-99.

Walker C, Sanders FE. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. Nov. from *Gigaspora* gerd. & trappe. *Mycotaxon* **27**: 169-182.

Walker C, Vestberg M, Demircik F, Stockinger H, Saito M, Sawaki H, Nishmura I, Schüßler A. 2007. Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales

(Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. Sp. Nov., Ambisporaceae fam. Nov., and emendation of *Archaeospora* and Archaeosporaceae. *Mycological Research* **111**: 137-153.

Yergeau E, Sommerville DW, Maheux E, Vujanovic V, Hamel C, Whalen JK, St-Arnaud M. 2006. Relationships between *Fusarium* population structure, soil nutrient status and disease incidence in field-grown *Asparagus*. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 394-403.

Annexe

Identification morphologique et étude des caractéristiques ultrastructurales chez des espèces de CMA

1. Introduction

La symbiose mutualiste est l'association intime et bénéfique d'au moins deux organismes vivants généralement très éloignés l'un de l'autre du point de vue taxonomique. Les mycorhizes font partie des systèmes symbiotiques les plus répandus dans la nature et consistent en une association symbiotique entre les racines des plantes et certains champignons. La symbiose mycorhizienne à arbuscules (ou l'endomycorhize arbusculaire) est de loin la plus commune et concerne plus de 80% des plantes aussi bien tempérées que tropicales. Cette association est extrêmement ancienne et existe depuis au moins 450 millions d'années. Il semble évident que l'apparition de cette association coïnciderait avec l'apparition des premières plantes dans l'écosystème terrestre (Redecker *et al.*, 2000b).

Depuis des millions d'années, cette association mutualiste joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement des écosystèmes végétaux. Cette association est caractérisée par un échange bidirectionnel généralement bénéfique tant pour la plante que pour le champignon (Jakobsen, 1995). D'une part, la mycorhize satisfait les besoins du partenaire fongique en composés carbonés synthétisés par la plante hôte et d'autre part, elle permet à la plante hôte de bénéficier d'une meilleure nutrition minérale (Smith *et al.*, 1994; Smith & Read, 1997) grâce au réseau d'hyphes extra-radicales qui s'étend bien au-delà de la zone du sol explorée par les racines. Le symbiote fongique réduit généralement le développement des maladies chez la plante et facilite l'accès à l'eau, lui permettant ainsi une résistance accrue aux stress biotiques et abiotiques (Smith & Read, 1997; St-Arnaud & Vujanovic, 2007).

Depuis deux décennies environ, la classification des champignons a été revue de manière fondamentale. En effet, les champignons ont été groupés en quatre divisions: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota et Basidiomycota dans le règne *Eumycota*. Ensuite, le nombre de divisions a été élevé à cinq avec la création d'un nouveau phylum regroupant les champignons mycorhiziens à arbuscule: Glomeromycota (Schüssler *et al.*, 2001a).

L'étude de la systématique des symbiotes cœnocytiens que sont les CMA s'est historiquement développée en se basant principalement sur la similarité morphologique des spores (Dalpé, 1995). Il s'agit de structures unicellulaires de forme généralement globosides à paroi épaisse, formée de plusieurs couches de différentes textures et reliées au réseau

filamenteux par un hyphes suspenseur de morphologie variable. La description morphologique des espèces de CMA nécessite des observations au microscope optique de spores écrasées parce que plusieurs caractères, spécialement ceux des Acaulosporaceae et Gigasporaceae, sont subcellulaires (Morton & Benny, 1990; Morton, 1993).

Les données morphologiques sont influencées par plusieurs facteurs tels que l'âge de la spore, la nature du sol, l'influence des conditions environnementales et la présence d'activité microbienne.

Dans cette annexe, je rapporte les principales caractéristiques ultra-structurales de certaines espèces de CMA. Ces observations ont été réalisées lors d'un stage d'une durée d'un mois au cours de l'été 2007 au laboratoire du Dr Yolande Dalpé (Centre de recherche de l'Est sur les céréales et les oléagineux d'Agriculture et agroalimentaire Canada, Ottawa). Cela m'a permis de me perfectionner dans l'identification des CMA sur la base de critères morphologiques.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel fongique

Les spores et les racines mycorhizées utilisées proviennent de plantes pièges cultivées *in vivo*, en pots ou dans des cone-tainer (Stuewe & Sons, Inc., USA), dans des chambres de cultures. La température dans les chambres de culture a été maintenue à 25°C avec la présence de lampes à vapeur de sodium qui émettent la chaleur pendant quatorze heures chaque jour. La plante-piège utilisée était le poireau (*Allium porrum*) en raison de sa croissance lente et son caractère mycotrophe marqué. Les jeunes racines de poireaux sont également translucides, ce qui facilite l'observation de la colonisation sous binoculaire. Les espèces de CMA échantillonnées appartiennent principalement à la famille des Glomaceae ainsi qu'à la famille des Gigasporaceae. La liste complète des espèces est présentée dans le tableau 3.1 ci-dessous, avec l'origine de la plante associée et du numéro de collection INVAM et/ou du code DAOM de l'herbier national de mycologie à Ottawa.

Tableau. 3.1 : Espèces de CMA utilisées dans l'étude des caractères morphologiques.

Espèce	Code INVAM	Code DAOM	Origine géographique	Plante associée
Glomeraceae				
<i>Glomus albidum</i>	4096	213202	Anse-a-Bellefleur, Côte-Nord, Québec	<i>Poa eminens</i>
<i>G. caledonium</i>	UK301-3	-----	Rothamsted, UK	-----
<i>G. constrictum</i>	-----	214832	(Aline Grenier), Macdonald College, Montréal	-----
<i>G. geosporum</i>	NE202	-----	Ferme expérimentale, Ottawa	-----
<i>G. kerguelense</i>	-----		Îles Kerguelen, Antarctique	<i>Agrostis stolonifera</i>
<i>G. lamellosum</i>	3938	212349	Parc provincial Wasaga, Ontario	<i>Ammophila breviligulata</i>
<i>G. mosseae</i>	-----	221475	Contamination de culture	<i>Allium porrum</i>
<i>G. multiforum</i>	-----	-----	J. Blaszkowski, Pologne	<i>Plantago major</i>
Gigasporaceae				
<i>Gigaspora margarita</i>	BB-2	-----	Rio Tinto, Espagne	----
<i>Scutellospora gilmorei</i>	4292	-----	Ferme expérimentale, Ottawa	<i>Poa pratensis</i>

2.2. Extraction des spores à partir du sol

2.2.1. Extraction des spores par tamisage humide

Un échantillon de 100g de sol provenant des cultures de poireau a été mis en suspension dans 500 ml d'eau du robinet et agité vigoureusement afin de séparer les propagules fongiques et les particules du sol. La suspension a été versée sur des tamis superposés à mailles décroissantes (500, 350, 150, 38 μm). Les racines et les grosses particules du sol ont été récupérées et conservées pour servir d'inocula pour de nouvelles cultures. Les spores retenues par les tamis de 350, 150 et 38 μm ont été récupérées et mises en suspension dans de l'eau distillée.

2.2.2. Séparation des spores avec une solution de saccharose

La suspension sporale a été centrifugée avec une solution de saccharose afin de concentrer les spores et de réduire la présence de particules de sol et de fragments de racines. Une bande de viscosité a été créée en injectant soigneusement au fond de chaque tube à centrifugation (50 ml) à l'aide de seringue 10 ml d'une solution de saccharose de 50% sous 10 ml de la suspension sporale. Les tubes ont été centrifugés (MSE Mistral 2000) pendant 3 minutes à une vitesse de 3000 rpm. Le sol et les débris ont sédimentés au fond des tubes à centrifugation. Les spores et les fines particules du sol se sont concentrées dans la solution de saccharose (surnageant). Le surnageant de chaque tube à centrifugation a été filtré sous vide sur papier Whatman numéro 2. Les spores d'apparence saine ont été extraites manuellement à l'aide d'une pince sous la loupe et conservées dans de l'eau distillée jusqu'à leur observation au microscope.

2.3. Coloration et identification des spores

Les spores ont été examinées sous la loupe binoculaire et les spores moribondes ont été éliminées. Les spores de chaque espèce ont été placées sur lame dans trois milieux de montage permanent: 1) le PVLG sans coloration préalable: polyvinyle alcool (16.6 g), acide

lactique (100 ml), glycérol (10 ml) et eau distillée (100 ml), 2) dans un milieu PVLG coloré au bleu coton-lactophénol et finalement 3) dans un milieu PVLG coloré au réactif Melzer.

L'identification des caractéristiques des spores et des hyphes a été r  alis  e à l'aide d'un microscope optique (DIC Nomarski, Nikon ECLIPSE E800) et les spécimens ont été photographiés à l'aide d'un appareil photo numérique Nikon reli  e au microscope.

La description des espèces et la détermination des couleurs ont été r  alis  es à l'aide de la clé d'identification de la collection internationale de culture de champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules (INVAM).

3. Résultats

3.1. *G. caledonium*

Les spores sont solitaires, globuleuses, de couleur jaune pâle à jaune doré et de taille variant de 90 à 350 μm de diamètre. L'observation de l'ultra-structure de la paroi sporale colorée au Melzer montre qu'elle est composée de quatre couches pariétales différentes chez les spores matures et de seulement deux couches pariétales (couches 1 et 2) chez les spores plus jeunes.

La couche P1 est mucilagineuse, hyaline, évanescence, difficile à observer chez les spores matures et parfois absente à cause du frottement dû au lavage lors de l'extraction des spores ou à cause de l'activité microbienne du sol (Fig. 3.1.A). Cette couche est d'environ 1 μm d'épaisseur, elle réagit au réactif Melzer et devient plus foncée, ce qui permet de mieux l'observer (Fig. 3.1.C). La couche P2 est également évanescence et hyaline. Elle est de 1 à 3,5 μm d'épaisseur et souvent adhérente à la couche P1 (Fig. 3.1.A et B).

La couche P3 est fragile, hyaline, mucilagineuse, attachée à P1 et à P2 et de 0,8 à 1,6 μm d'épaisseur.

La couche P4 est laminée, de couleur jaune pâle à jaune doré, composée de plusieurs sous-couches très minces, de 0,5 μm d'épaisseur chacune et qui s'épaississent avec la maturation de la spore. Elle est de 4 à 6,4 μm d'épaisseur chez la spore mature et n'est pas observée chez les spores jeunes (Fig. 3.1.B).

L'hyphe suspenseur de *G. caledonium* est unique, cylindrique, légèrement évasé, parfois septé, de couleur jaune pâle à jaune doré et de 14,5 à 26 μm de diamètre vers le point d'attache avec la spore (Fig. 3.1.C).

La paroi de l'hyphe est formée par la prolongation des parois sporales à l'exception de la P1 qui est complètement absente chez les spores matures. Sa couleur varie entre jaune pâle et jaune doré et l'épaisseur varie de 3,8 à 6,5 μm vers la base de la spore.

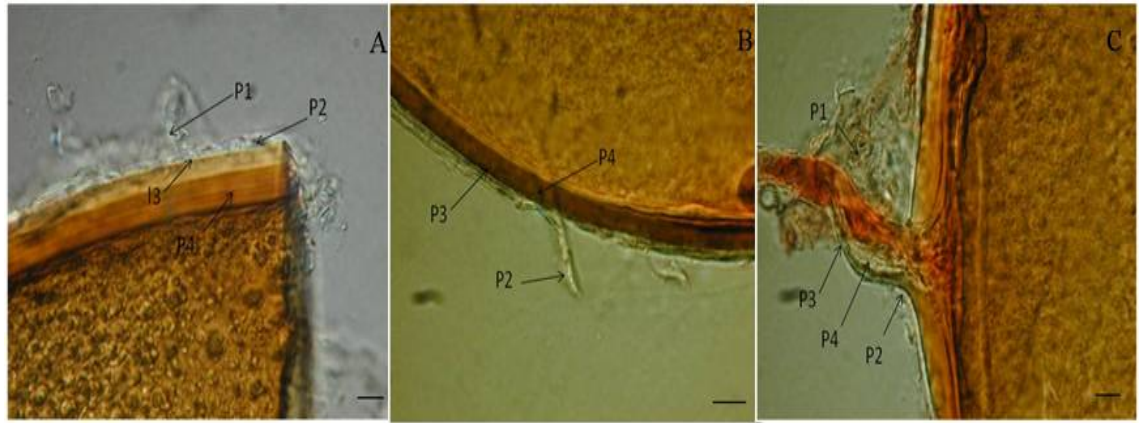


Fig. 3.1. Caractéristiques morphologiques de la paroi sporale et de l'hyphe de *G. caledonium*. A: aspect de la paroi sporale observée sous PVLG sans coloration préalable; B: aspect des couches pariétales avec le réactif Melzer; C: structure de l'hyphe suspenseur et la composition de sa paroi avec le réactif Melzer. Échelle = 200 μm . (photographie N. Zeramardini).

3.2. *G. constrictum*

Les spores de *G. constrictum* sont individuelles dans le sol, de forme globuleuses, parfois ovoïdes, de couleur brun orange à brun foncé et de 100 à 220 μm de diamètre avec une moyenne de 160 μm de diamètre.

La paroi sporale est formée de deux couches pariétales : la couche P1, évanescence, hyaline à jaune pâle et de 0,8 à 2,5 μm d'épaisseur (Fig. 3.2.A). Cette couche est toujours présente, mais peut être partiellement absente ou totalement détruite selon l'âge de la spore et l'activité microbienne du sol (Fig. 3.2.B). La couche P2, laminée, de couleur brun orange à brun foncé et de 7,5 à 12 μm d'épaisseur et adhérente à P1. Les deux parois ne réagissent pas au réactif Melzer.

L'hyphe suspenseur est unique, cylindrique, orange à brun foncé. Il est caractérisé par la présence d'une constriction au niveau du point d'attache avec la spore, d'où le nom du *G. constrictum* (Fig. 3.2.C).

Son diamètre varie de 17 μm au niveau de la constriction à environ 22 μm pour de la partie cylindrique.

Sa paroi est formée par le prolongement des deux parois sporales P1 et P2, de couleur brun orange à brun foncé et de 6 μm d'épaisseur.

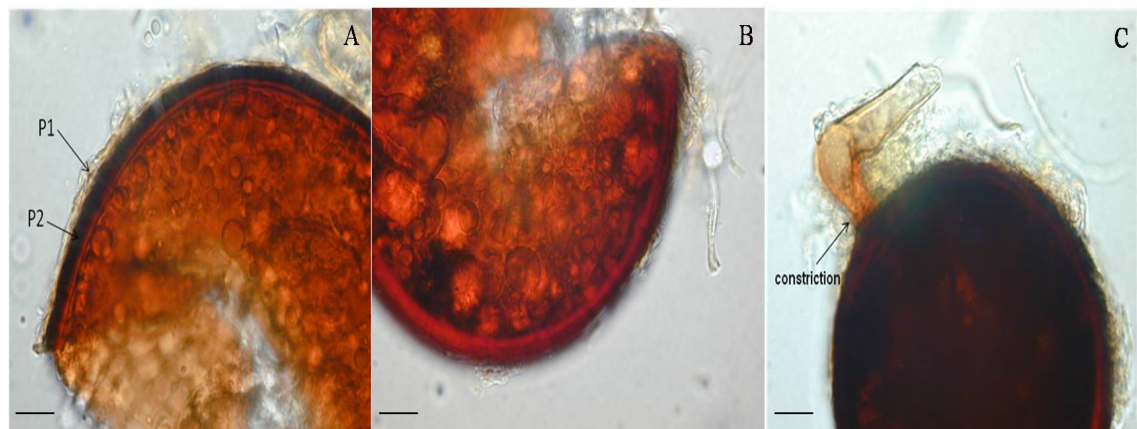


Fig. 3.2. Structure de la paroi sporale de *G. constrictum*. A : spore écrasée montrant la présence des deux couches pariétales P1 et P2; B : structure de la P1; C : spore entière de *G. constrictum* avec présence de la constriction au niveau de l'hyphe. Échelle A, B = 100 μm , C = 50 μm . (photographies N. Zeramdini).

3.3. *G. geosporum*

Les spores sont formées individuellement dans le sol, globuleuses, parfois ovoïdes, de couleur orangé à brun-roux et de 130 à 260 μm de diamètre. La paroi sporale est formée par trois couches pariétales. La paroi P1 est évanescence, hyaline, de 1,1 μm d'épaisseur, souvent couverte de débris de sol, généralement absente chez les spores matures. La P1 a été observée sur quelques jeunes spores seulement.

La P2 est laminée, de couleur brun-roux à brun foncé, d'environ 9,5 μm d'épaisseur et elle ne réagit pas au réactif Melzer. La P3 est membranaire, semi-rigide, orangé à brun pâle, de 1 μm d'épaisseur, forme un septum au niveau de l'hyphe et se décolle de P2 lors de l'écrasement de la spore (Fig. 3.3).

L'hyphe suspenseur est unique, droit ou légèrement évasé, souvent recourbé, de 15 à 28 μm de diamètre au point d'attache avec la spore. Sa paroi est formée par le prolongement de la paroi sporale P2 (Fig. 3.3). Le pore de l'hyphe est le plus souvent fermé par une cloison formée par la couche membranaire P3.

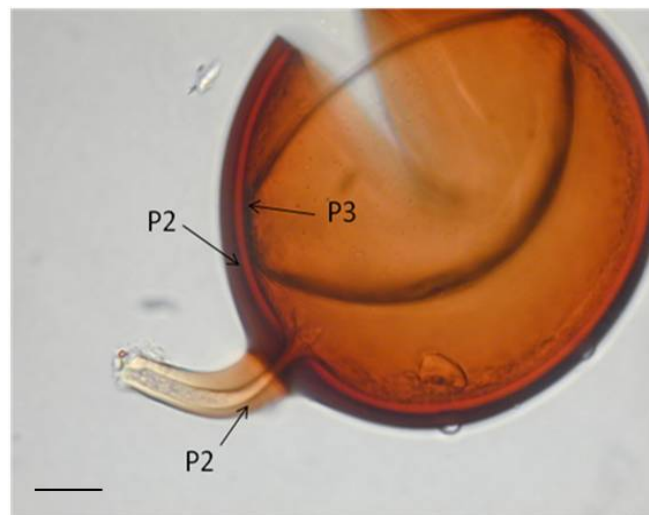


Fig. 3.3. Structure de la paroi sporale et la structure de l'hyphe suspenseur de *G. geosporum* avec PVLG sans coloration préalable. Échelle = 100 μm . (photographie N. Zeramardini).

3.4. *G. mosseae*

Les spores sont présentes dans le sol à l'état solitaire, en agrégats ou en sporocarpes, de couleur jaune pâle à jaune doré à la maturité de la spore. Elles sont globuleuses, parfois de formes irrégulières et leur taille va de 80 à 280 μm de diamètre. La paroi sporale est formée de trois couches pariétales. La couche P1 mucilagineuse, hyaline, de 0,5 à 2 μm d'épaisseur, réagit au réactif Melzer et devient rouge. Elle n'est généralement présente que chez les jeunes spores (Fig. 3.4.A). La couche P2, flexible, hyaline, de 0,8 à 1,8 μm d'épaisseur est rarement présente chez les spores matures. La couche P3 est laminée, jaune dorée et de 2,8 à 7,2 μm d'épaisseur. Elle réagit au réactif Melzer et devient orange foncée (Fig. 3.4.B).

L'hyphe suspenseur est unique, évasé, de couleur jaune doré et de 12,5 à 30 μm de diamètre. Sa paroi est formée par la prolongation des trois parois sporales, mais chez les spores matures, on n'observe que la P3 (Fig. 3.4.C).

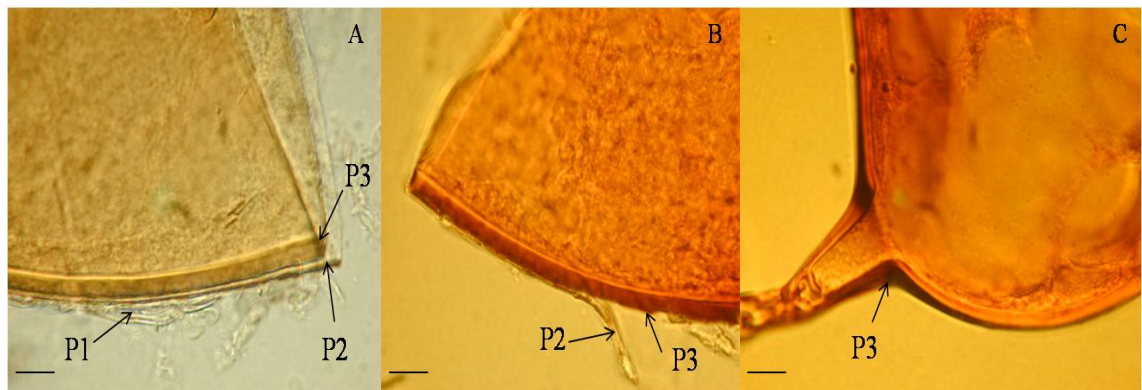


Fig. 3.4. Caractéristiques morphologiques de la spore et de l'hyphe de *G. mosseae*. A: structure de la paroi sporale avec PVLG sans coloration préalable; B: structure de la P2 et P3 avec le réactif Melzer; C: structure de la paroi de l'hyphe avec le réactif Melzer. Échelle = 100 μm . (photographies N. Zeramdingi).

3.5. *G. lamellosum*

Les spores sont solitaires, globuleuses, parfois sphériques, blanchâtre à jaune pâle, de 86 à 140 μm de diamètre. La paroi sporale est formée par trois couches pariétales.

La couche P1 est hyaline, de 2,2 à 10,5 μm d'épaisseur, couverte de petites lamelles qui disparaissent graduellement avec la maturité de la spore (Fig. 3.5.B). La couche P2 est laminée, jaune blanc à jaune pâle, de 2 à 16 μm d'épaisseur. La couche P3 est membranaire, hyaline, très fine, difficile à observer, de 0,2 à 1 μm d'épaisseur et elle est détachable de la paroi P2 (Fig. 3.5.B). La coloration des spores au réactif Melzer rend plus visible l'observation des laminations des couches P1 et P2 (Fig. 3.5.B).

L'hyphe suspenseur est unique, droit, légèrement évasé, de 8,3 à 15,2 μm de diamètre au point d'attache avec la spore, parfois septé mais difficile à distinguer. Sa paroi est formée par le prolongement de la P1 et de la P3; la P2 disparaît au niveau du pore de l'hyphe (Fig. 3.5.A). Les couches pariétales des spores ne réagissent pas avec le réactif bleu coton au lactophénol (Fig. 3.5.C).

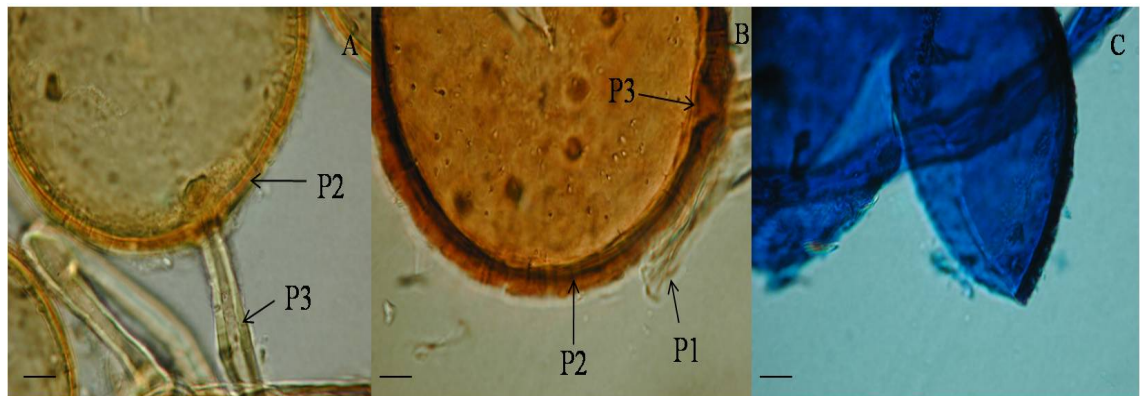


Fig. 3.5. Caractéristiques morphologiques de la spore de *G. lamellosum*. A: structure des couches pariétales avec PVLG sans coloration; B: observation des parois pariétales avec PVLG coloré au réactif Melzer; C: observation de l'absence de réaction des parois au contact avec le réactif bleu coton au lactophénol. Échelle = 100 μm . (photographies N. Zeramardini).

3.6. *G. multiforum*

Les spores sont individuelles, globuleuses, parfois ovoïdes, jaune doré à brunes et de 170 à 230 μm de diamètre. La paroi sporale est formée par trois couches pariétales. La couche P1 est mucilagineuse, hyaline, de 0,5 à 1,7 μm d'épaisseur, généralement absente chez les spores matures et elle devient rouge au contact du réactif Melzer (Fig. 3.6.A).

La couche P2 est semi-flexible, hyaline, de 0,5 à 2,9 μm d'épaisseur et détachable de P1 et de P3 (Fig. 3.6.B). La couche P3 est laminée, jaune à brune, de 5,6 à 9,6 μm d'épaisseur, ornementée par des granules semblables à des pores, d'où le nom *G. multiforum* (Fig. 3.6.A).

L'hyphe suspenseur est unique, droit, parfois en entonnoir fermé ou légèrement fermé, jaune foncé à brun et de 2,7 à 31,9 μm de diamètre au point d'attache avec la spore. Sa paroi est formée par le prolongement des trois couches pariétales.

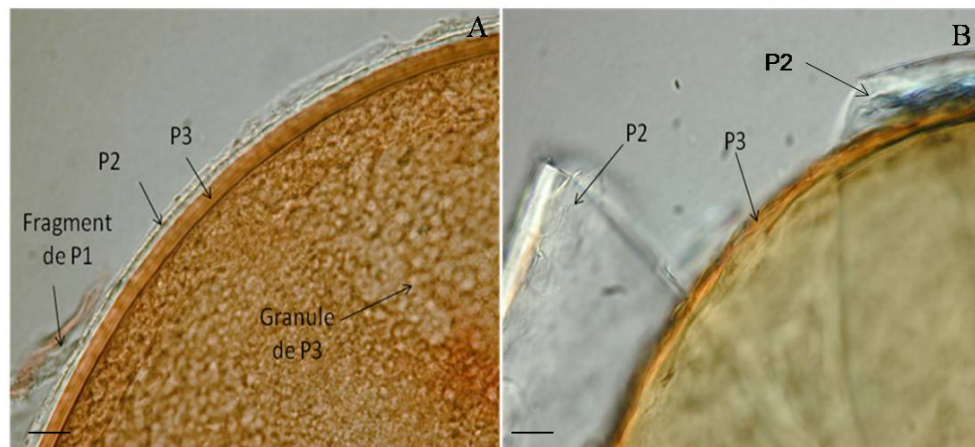


Fig. 3.6. Caractéristiques morphologiques de la spore de *G. multiforum*. A: observation de la structure des couches pariétales et de l'aspect granuleux de la P3 avec du PVLG coloré au réactif Melzer; B: structure détaillée de la P2 et de la P3. Échelle A = 100 μm , B = 200 μm . (photographies N. Zeramdini).

3.7. *G. albidum*

Les spores sont solitaires dans le sol, globuleuses, parfois irrégulières, blanches à jaune pâle, de 80 à 150 μm de diamètre. La paroi sporale est formée de trois parois pariétales. La couche P1 est hyaline, évanescence, de 0,5 à 2 μm d'épaisseur, se dégrade graduellement avec l'âge de la spore. La couche P2 est hyaline, mucilagineuse, jaune pâle, de 0,5 à 2 μm d'épaisseur et réagit au Melzer devenir jaune foncée (Fig. 3.7.A). La couche P3 est laminée, de 5 à 9 μm d'épaisseur et réagit au Melzer (Fig. 3.7.B).

L'hyphe suspenseur est unique, difficile à observer, cylindrique est légèrement évasé vers le point d'attache avec la spore et parfois fermé. La paroi de l'hyphe est formée par le prolongement de la P2 et de la P3. La P2 est très fine, de 0,5 μm d'épaisseur et la P3 est de 1,5 μm d'épaisseur (Fig. 3.7.B).

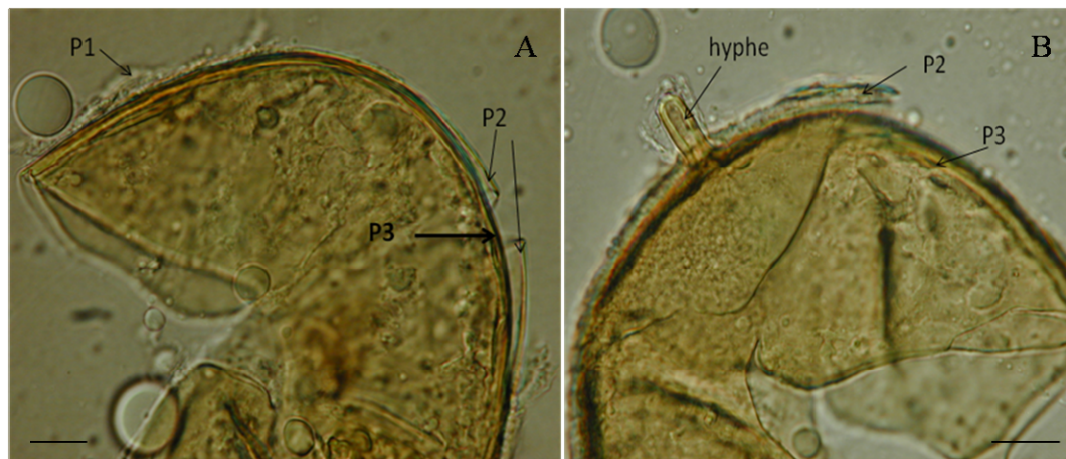


Fig. 3.7. Caractéristiques morphologiques de la spore de *G. albidum*. A: structure des couches pariétales avec du PVLG coloré au Melzer; B: structure de P2, de P3 et structure de l'hyphe suspenseur. Échelle = 50 μm . (photographies N. Zeramdini).

3.8. *G. kerguelense*

Les spores sont individuelles, parfois en groupe, globuleuses, jaune pâle à jaune dorée, de 90 à 125 μm de diamètre. La paroi sporale est formée par trois couches pariétales de 3 à 10 μm d'épaisseur. La couche P1 est hyaline, évanescente, mucilagineuse, rugueuse, irrégulière, de 0,5 à 1,5 μm d'épaisseur et parfois absente chez les spores matures. La couche P2 est hyaline à jaune doré selon l'âge de la spore, laminée et de 2 à 6 μm d'épaisseur. La couche P3 est membranaire, jaune doré et de 1,5 à 2,5 μm d'épaisseur (Fig. 3.8.A, B). Les trois couches ne réagissent pas au réactif Melzer.

L'hyphe suspenseur est unique, cylindrique, légèrement évasé vers la base de la spore, de 8 à 17 μm de diamètre. La paroi de l'hyphe est formée par le prolongement des parois sporales P1 et P2, hyaline à jaune doré et de 1,5 à 6 μm d'épaisseur vers la base de la spore. Le pore est fermé par un septum formé par la paroi sporale P3 (Fig. 3.8.B).

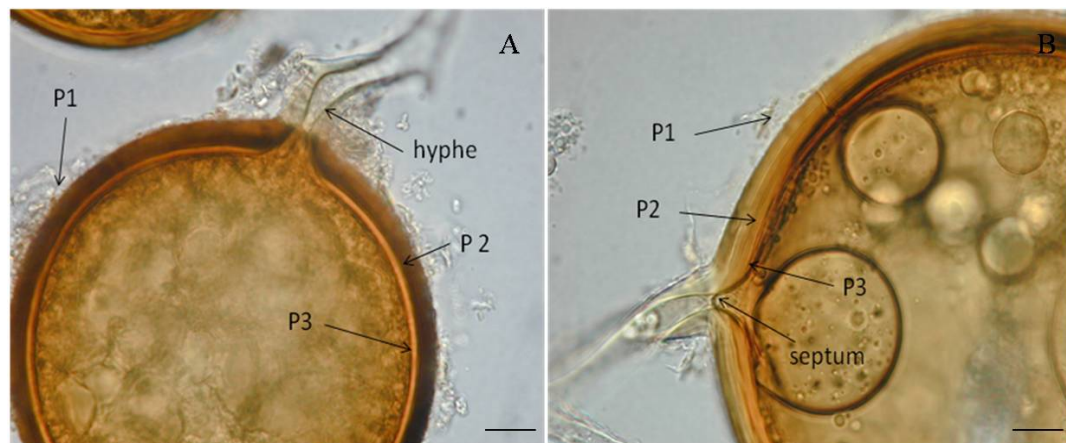


Fig. 3.8. Structure de la paroi sporale de *G. kerguelense*. A: structure des couches pariétales d'une spore jeune avec la présence des trois parois pariétales; B: structure des couches pariétales d'une spore mature montrant la P1 partiellement dégradée et le septum formé par la P3 au niveau de l'hyphe suspenseur. Échelle = 100 μm . (photographies N. Zeramdini).

3.9. *Scutellospora gilmorei*

Les spores sont solitaires, globuleuses, de 180 à 300 μm de diamètre et de couleur blanche à jaune pâle à l'état adulte. Sa paroi sporale est formée par deux couches pariétales et une paroi de germination avec une épaisseur totale de 26 μm . La première couche pariétale (P1) est lisse, rigide, craque sous la pression de la lamelle, blanche à jaune très pâle et de 2,5 à 5 μm d'épaisseur. Elle réagit au réactif Melzer et devient brun foncé; elle réagit également au réactif bleu coton au lactophénol (Fig. 3.9.A, B, C).

La deuxième couche pariétale (P2) est laminée, flexible, jaune pâle, d'environ 7,5 μm d'épaisseur; elle réagit au réactif Melzer et devient brun-roux (Fig. 3.9.B). La paroi de germination (P3) est membranaire, jaune pâle, d'environ 2,5 μm d'épaisseur et sa surface externe est granuleuse (Fig. 3.9.A, B).

L'hyphe suspenseur est unique, bulbeux, septé, de couleur jaune doré à brun pâle et de 30 à 40 μm de diamètre (Fig. 3.9.C). L'observation de la structure de la paroi de l'hyphe n'a pas été possible à cause de la position de l'hyphe dans le milieu de montage.

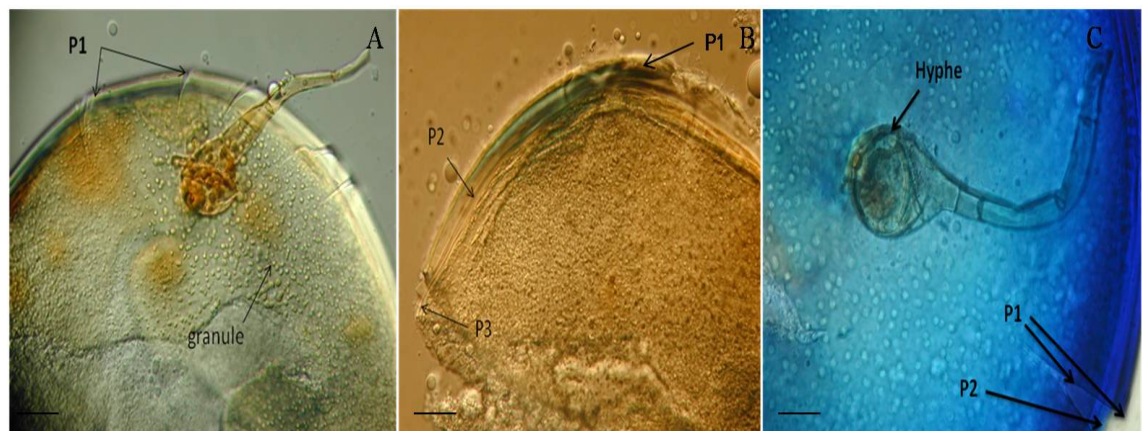


Fig. 3.9. Caractéristiques morphologiques de la spore de *Scutellospora gilmorei*. A: structure de la couche P1 avec PVLG sans coloration; B: aspect laminé de la couche P2 et aspect granuleux de la paroi de germination P3 avec du PVLG coloré au réactif Melzer; C: structure de la couche P1 et de la P2 avec du PVLG coloré au réactif bleu coton au lactophénol et observation des cloisons au niveau de l'hyphe suspenseur. Échelle = 100 μm . (photographies N. Zeramdini).

3.10. *Gigaspora margarita*

Les spores sont individuelles, globuleuses, ovoïdes, de 260 à 405 μm de diamètre et hyalines à l'état jeune et devenant jaune pâle avec la maturité de la spore. La structure de la paroi sporale est composée de deux couches pariétales et d'une paroi de germination. La couche P1 est hyaline, permanente et de 1,7 à 2,2 μm d'épaisseur. La couche P2 est formée de plusieurs laminations, dont le nombre augmente avec l'âge, de couleur jaune pâle à jaune orangé et de 19,4 à 26,2 μm d'épaisseur. Elle réagit avec le réactif Melzer et devient de couleur rouge. La paroi de germination (Pg) est flexible, collée à la paroi P2 et de 1,5 à 1,8 μm d'épaisseur (Fig. 3.10.A).

L'hyphe suspenseur est bulbeux, de 52,5 à 100 μm de diamètre vers la base de la spore, septé, de couleur jaune brune, plus foncé que la spore et sa paroi est composée de la prolongation des deux couches pariétales P1 et P2 (Fig. 3.10.B). Les cellules auxiliaires sont groupées en agrégats de 5 à 11 cellules, globuleuses à ovoïdes et de couleur hyaline à jaune pâle avec une paroi très mince (environ 1 μm d'épaisseur) et ornée de petites bulles à la surface externe (Fig. 3.10.C).

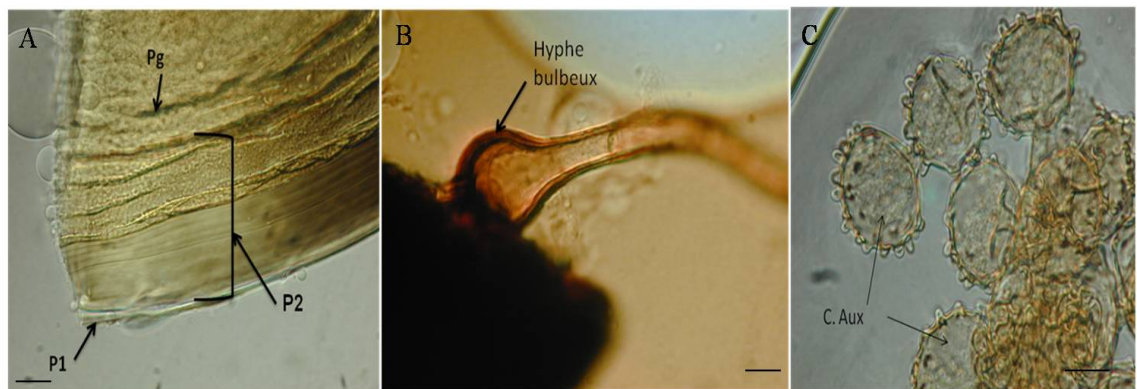


Fig. 3.10. Caractéristiques morphologiques de la spore de *Gigaspora margarita*. A: structure de la paroi sporale; B: structure de l'hyphe suspenseur coloré au réactif Melzer; C: structure des cellules auxiliaires. Échelle A = 100 μm , B, C = 50 μm . (photographies N. Zeramdini).

4. Conclusion

Mes résultats mettent en évidence la diversité des caractères morphologiques chez les CMA au sein de chaque famille: Glomaceae et Gigasporaceae. La taille des spores varie entre espèces du genre *Glomus*. La taille minimale des spores varie de 80 à 170 μm et la maximale varie de 125 à 380 μm . La couleur des spores varie aussi entre espèces du même genre. Par exemple, la couleur des spores de *G. kerguelense*, *G. mosseae* et *G. caledonium* varie de jaune pâle à doré, celle des spores de *G. geosporum* varie d'orange à brun foncé, alors que les spores de *G. albidum* sont blanches à jaune pâle selon la maturité de la spore. L'aspect de la paroi sporale varie aussi entre espèces. Par exemple, la paroi sporale de *G. multiforum* a un aspect poreux alors que celle de *G. lamellosum* est laminée. Ma description des spores de *G. lamellosum* concorde avec celle de la description originale (Dalpé *et al.*, 1992). Cette diversité est encore plus accentuée si on compare les caractéristiques des deux familles entre elles. En effet, le diamètre des spores des Glomaceae varie de 80 à 380 μm alors que celui des spores des Gigasporaceae varie de 180 à 405 μm . Le nombre de couches pariétales varie aussi entre les espèces de familles différentes. La paroi sporale des espèces du genre *Glomus* est composée de trois couches pariétales alors que celle de *Gigaspora margarita* et de *Scutellospora gilmorei* sont composées de deux couches pariétales et d'une paroi de germination (Pg). La forme de l'hyphe suspenseur varie entre espèces du même genre et entre espèces de genres différents. Par exemple, l'hyphe suspenseur de *G. kerguelense* est légèrement évasé et fermé par un septum au niveau du point d'attache avec la spore. Celui de *G. geosporum* est droit et souvent recourbé alors que celui des spores des Gigasporaceae est bulbeux et de grande taille (10 à 40 μm).

Malgré que la technique de centrifugation ne permette pas la récupération d'une grande quantité de spores parce que de nombreuses spores sédimentent au fond des tubes à centrifugation. J'ai réussi à obtenir une trentaine de spores, ce qui a permis une bonne identification pour la plupart des espèces. J'ai obtenu un nombre très faible de spores pour certaines espèces, dont *G. geosporum* et *G. albidum*. Ce nombre réduit de spores était probablement dû à une faible sporulation lors de l'échantillonnage.

Les caractéristiques morphologiques des spores de certaines espèces diffèrent parfois avec les études morphologiques antérieures. Ainsi, le diamètre des spores de *G. albidum* varie de

80 à 150 μm contre 90 à 120 μm dans la description d'origine (Oehl *et al.*, 2005). Les spores dans mon échantillon de *G. albidum* étaient présentes à l'état solitaire contrairement à ce qui a été rapporté par Oehl *et al.* (2005) qui rapportent que les spores du *G. albidum* étaient formées uniquement en sporocarpe.

Mes résultats montrent des concordances avec des descriptions antérieures de certaines espèces. Par exemple, la description originale du *Gigaspora margarita* montre bien que ses spores sont globuleuses à ovoïdes, de grande taille (320 à 440 μm) et de couleur hyaline à jaune pâle (Becker & Hall, 1976). Cependant, ces auteurs rapportent que la paroi sporale de *Gigaspora margarita* est formée par une paroi unique composée de 4 à 7 laminations (Becker & Hall, 1976), alors qu'au cours de mes observations j'ai noté une couche pariétale (P1) très fine, hyaline et bien séparée de la couche laminée P2 et une paroi de germination (Pg) collée à P2. Il est possible que la Pg que j'ai observée soit en réalité une lamelle de la P2. Bien que l'observation des hyphes n'ait pas toujours été facile à cause de leur positionnement sous la spore lors du montage des lames. J'ai toutefois réussi à observer les septas de l'hyphe suspenseur de *Gigaspora margarita*. Ma description concorde avec la description originale de cette espèce qui rapporte que l'hyphe est bulbeux, plus foncé que la spore et régulièrement cloisonné (Becker & Hall, 1976; Dalpé, 1994).

La description des spores de *Scutellospora gilmorei* concorde avec la description originale de cette espèce qui rapporte que cette espèce est caractérisée par des spores globuleuses de grande taille (204 à 320 μm de diamètre) et de couleur hyaline à l'état jeune à jaune pâle avec la maturité. Sa paroi sporale est formée de deux couches pariétales et d'une paroi de germination. Son hyphe suspenseur est bulbeux, de couleur brun pâle et généralement cloisonné (Gerdemann & Trappe, 1974). En plus de la description originale de *Scutellospora gilmorei* (Gerdemann & Trappe, 1974), seulement deux études ont cité cette espèce sans la décrire morphologiquement (Ho, 1977; Diederichs, 1991). L'aspect granuleux de la paroi de germination (P3) de *Scutellospora gilmorei* que j'ai réussi à identifier en me basant sur la clé d'identification développée dans la collection INVAM, n'a pas été mentionné dans aucune de ces études.

Les caractères morphologiques sont réduits et souvent variables selon la maturité des spores étudiées. Les approches moléculaires représentent donc un outil qui permettrait, à l'aide de

marqueurs moléculaires spécifiques, d'étudier la biodiversité des CMA dans leur habitat naturel.